

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Caracterización de la actividad de las enzimas
hidrolíticas localizadas en la región cecal de cuyes
(*cavia porcellus*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Madeline Victoria García Leandro

Lima – Perú

2012



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral:

Nº 074-EAPMV/FMV-2012

PRESIDENTE :

TERESA ARBAIZA FERNÁNDEZ

MIEMBROS :

FERNANDO CARCELÉN CÁCERES
Director de la Tesis

JOSÉ BUSTAMANTE LAVERDE

CHRIS PINTO JIMÉNEZ

San Borja, 18 de Mayo del 2012

Vº Bº

MV. ALBERTO MANCHEGO SAYÁN
Director de la Escuela Académico Profesional de
Medicina Veterinaria





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO-PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el auditorio principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **viernes 18 de Mayo del 2012**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° **074-EAPMV/FMV-2012**, integrado por los siguientes profesores:

TERESA ARBAIZA FERNÁNDEZ	Presidente del Jurado
FERNANDO CARCELÉN CÁCERES	Director de la Tesis
JOSÉ BUSTAMANTE LAVERDE	Miembro del Jurado
CHRIS PINTO JIMÉNEZ	Miembro del Jurado

Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, la Bachiller Doña: **GARCÍA LEANDRO, MADELINE VICTORIA**, para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS LOCALIZADAS EN LA REGIÓN CECAL DE CUYES (*Cavia porcellus*)”

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Director de Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:20 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:

Teresa Arbaiza Fernández: Mg. Prof. Principal, D.E.

Fernando Carcelén Cáceres: Mg. Prof. Principal, D.E.

José Bustamante Laverde: MV. Prof. Principal, D.E.

Chris Pinto Jiménez. Dra. Profesora Contratada



DEDICATORIAS

A Dios, nuestro maravilloso creador, por haberme permitido terminar este trabajo y darme su bendición.

A mi mami, por ser una persona maravillosa, por haberme permitido nacer y hacerme sentir su inmenso amor, por disculpar mis errores y ser el mejor ejemplo de lucha y superación.

A mis hermanos queridos: Oty, Mary, Jonás y Daniel, por quererme, apoyarme y ayudarme siempre, por darme una linda familia. Sobre todo a Oty por ser una mujer integra, inteligente y mi ejemplo a seguir día a día.

AGRADECIMIENTOS

- A **Silvia Suarez C.**, por ser una maestra en todo el sentido de la palabra, por tener la paciencia de enseñarme y aconsejarme día a día con la mejor actitud y sobre todo por ser una excelente persona y amiga.
- A **Fernando Carcelén**, por haberme apoyado cuando más lo necesitaba y darme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo.
- A mis amigos en especial a **Eliana**, por ayudarme a la toma de muestras y por su constante apoyo y amistad. **Alicia**, por ayudarme en el procesamiento de las muestras y acompañarme siempre. A **Melissa** por ser la camarógrafa y ser una amiga incondicional. A **Kely**, por tantos años de amistad y acogerme en su hogar.
- A mi *alma mater*, la **Facultad de Medicina Veterinaria** de la **UNMSM**, por haberme acogido en sus aulas y brindarme la oportunidad de conocer gente maravillosa y excelentes maestros.

ÍNDICE DEL CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIAS	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DEL CONTENIDO	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE APÉNDICES	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
II.1.EL CUY (<i>Cavia porcellus</i>)	3
II.1.1. Historia y evolución	3
II.1.2. Características generales del cuy	4
II.1.3. Utilidad del cuy	6
II.1.3.1. En la alimentación humana	6
II.1.3.2. En la investigación	6
II.1.3.3. Como mascotas	6
II.1.4. Importancia socioeconómica	7
II.2.ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DIGESTIVA DEL CUY	8
II.2.1. Sistema digestivo del cuy	9
II.3.MICROORGANISMOS DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CUY	12
II.4.ENZIMAS HIDROLÍTICAS o HIDROLASAS	16
II.4.1. Las amilasas	17
II.4.2. Las celulasas	19
II.4.3. Las proteasas	20
II.4.4. Las lipasas	21
II.5.UTILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS	22

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
III.1.	LUGAR DE ESTUDIO	24
III.2.	TAMAÑO DE MUESTRA	24
III.3.	COLECCIÓN DE MUESTRAS	25
III.4.	PROCESAMIENTO DE MUESTRA	25
III.5.	CARACTERIZACION DE ENZIMAS	25
III.5.1.	Actividad celulolítica y amilolítica	25
III.5.2.	Actividad proteolítica	27
III.5.3.	Actividad lipolítica	27
III.5.4.	Cuantificación de proteínas	28
III.6.	ANÁLISIS DE DATOS	28
IV.	RESULTADOS	29
IV.1.	ACTIVIDAD CELULOLÍTICA	29
IV.2.	ACTIVIDAD AMIOLÍTICA	31
IV.3.	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	33
IV.4.	ACTIVIDAD LIPOLÍTICA	35
V.	DISCUSIÓN	38
VI.	CONCLUSIONES	44
VII.	RECOMENDACIONES	45
VIII.	LITERATURA CITADA	46
IX.	APÉNDICE	54

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad de las enzimas hidrolíticas localizadas en la región cecal de cuyes (*Cavia porcellus*) bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Se sacrificaron 5 cuyes machos al final del engorde (peso: 1022g), de los cuales se extrajo el contenido del ciego. Este contenido fue sometido a métodos físicos (agitador magnético, sonicación y centrifugación) para extraer las enzimas cecales (EC). Se midió la actividad específica de las EC a diferente temperatura (20°C, 30°C y 40°C) y pH (5, 7 y 9). Estas EC mostraron actividad celulolítica, la más alta se presentó a 40°C y pH 9 (**21.8** U/g proteína), mientras que la más baja a 20°C y pH 5 (**13.2** U/g proteína). La actividad amilolítica de las EC más altas se presentaron a 40°C (**441.5, 452.7 y 499.3** U/g proteína) y las más bajas a 20°C (**188.7, 174.1 y 150.4** U/g proteína). Sin embargo, el pH no afectó la actividad amilolítica. La actividad amilolítica fue aproximadamente 10 veces mayor a la actividad celulolítica. En cuanto a las EC con actividad proteolítica, a 20°C y pH 5 se presentó el valor más alto (**290** U/g proteína) y la más baja a 30°C y pH 9 (**104** U/g proteína). Finalmente, las EC con actividad lipolítica presentaron mayor actividad a pH 9 (**4.05** U/mg proteína) y la más baja a pH 5 (**3.18** U/mg proteína). La temperatura no afectó la actividad de las EC con capacidad lipolítica. Los resultados de este estudio evidencian la intensa actividad amilolítica y celulolítica en el ciego del cuy, siendo más intensa la actividad amilolítica. Estos datos sugieren el potencial biotecnológico que poseen estas enzimas. La administración de estas enzimas en el alimento de cuyes podría influir de manera positiva en el rendimiento de esta especie.

Palabras claves: cuy, ciego, enzimas, amilolítica, celulolítica, proteolítica, lipolítica.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the activity of hydrolytic enzymes located in the cecal region of guinea pigs (*Cavia porcellus*) under different conditions of pH and temperature. Five male guinea pigs were sacrificed at the end of fattening (weight: 1022g). The content of the cecum was and extracted of them. This content was subjected to physical methods (magnetic stirrer, sonication and centrifugation) to remove cecal enzymes (CE). Specific activity was measured in the CE at different temperatures (20 ° C, 30 ° C and 40 ° C) and pH (5, 7 and 9). These CE showed cellulolytic activity, the highest was submitted to 40 ° C and pH 9 (21.8 U / g protein), while than lower was (13.2 U / g protein) at 20 ° C and pH 5. Amylolytic activity of CE showed higher at 40 ° C (441.5, 452.7 and 499.3 U / g protein) and the lowest at 20 ° C (188.7, 174.1 and 150.4 U / g protein). However, the pH did not affect the amylolytic activity. Amylolytic activity was approximately 10 times the cellulolytic activity. As to the CE with proteolytic activity at 20 ° C and pH 5 showed the highest value (290 U / g protein) and lowest at 30 ° C and pH 9 (104U / g protein). Finally, the CE with lipolytic activity showed higher activity at pH 9 (4.05 U / mg protein) and lowest at pH 5 (3.18 U / mg protein). The temperature did not affect the activity of lipolytic capacity CE. The results of this study demonstrate the amylolytic and cellulolytic intense activity in the cecum of the guinea pig, being more intense amylolytic activity. These data suggest that these enzymes possess biotechnology potential. The administration of these enzymes in the guinea pig food could positively influence the performance of this species.

Keywords: guinea pig, cecum, enzymes, amylolytic, cellulolytic, proteolytic, lipolytic.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: grados Celcius

μL: Microlitro

dL: Decilitro

DMSO: Dimetilsulfóxido

g: gravedades

Gram -: Bacterias con tinción Gram negativa

Gram +: Bacterias con tinción Gram positiva

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mM: milimolar

N: normal

nm: nanómetro

p/v: Peso/volumen

U: Unidad enzimática

X: promedio

σ: Desviación estándar

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Clasificación de los animales según su anatomía gastrointestinal propuesta por Van Soest.....**Pág. 8**

Cuadro 2: Clasificación de las enzimas según la International Union of Pure and Applied Chemistry y International Union of Biochemistry and Molecular Biology.....**Pág. 17**

Cuadro 3: Algunos microorganismos que degradan la celulosa.....**Pág. 20**

Cuadro 4: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....**Pág. 29**

Cuadro 5: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad amilolítica (U/g proteína) de enzimas cecales de cuyes.....**Pág. 32**

Cuadro 6: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica (U/mg proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....**Pág.34**

Cuadro 7: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lipolítica (U/mg proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....**Pág.36**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aparato digestivo del cuy (<i>Cavia porcellus</i>).....	Pág. 10
Figura 2: Degradación del almidón.....	Pág. 18
Figura 3: Hidrólisis del enlace peptídico.....	Pág. 20
Figura 4: Mecanismo de acción de lipasas.....	Pág. 22
Figura 5: Efecto de la temperatura sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....	Pág. 30
Figura 6: Efecto del pH sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....	Pág. 31
Figura 7: Efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....	Pág. 32
Figura 8: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica (U/mg proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....	Pág. 34
Figura 9: Efecto del pH sobre la actividad proteolítica (U/mg proteína) de las enzimas cecales de cuyes.....	Pág. 35
Figura 10: Efecto del pH sobre la actividad lipolítica (U/mg proteína) de las enzimas	

I. INTRODUCCION

El cuy (*Cavia porcellus*) es una especie que posee un gran potencial, tanto en el campo productivo como por las características nutricionales que presenta su carne. El consumo de cuy en los últimos años se ha incrementado, ya que, la demanda de este producto ha aumentado a nivel nacional y en algunas ciudades del mundo. Sin embargo, existe una demanda potencial aún mayor a esta, la cual no podría ser satisfecha por la menor producción. Diversos factores como el mal manejo de los animales, escasez de alimento, entre otras limitan la producción de cuyes (Zevallos, 2001; INIA, 2003).

El paso de la crianza familiar del cuy a un sistema familiar-comercial y comercial ha traído consigo una serie de problemas y beneficios en su crianza del cuy. La presencia de enfermedades y su prevención conllevan al uso de antibióticos, el uso indiscriminado produce la emergencia de cepas bacterianas resistentes, si bien éstas terapias controlan los microorganismos patógenos, también afectan a muchos microorganismos benéficos produciendo trastornos en el equilibrio de la microbiota intestinal y modificaciones en el tejido del intestino delgado. Muchos de éstos antibióticos pueden quedar como residuos en los tejidos animales (Fuller, 1997).

Estas desventajas han estimulado el interés por el uso de aditivos alimentarios naturales y terapias alternativas no medicamentosas en reemplazo de los antibióticos. Dentro de las alternativas de reemplazo se pueden mencionar el uso de probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgánicos, extractos naturales entre otros. El empleo de estos aditivos en la alimentación animal ha evidenciado respuestas positivas.

La inclusión de enzimas en la dieta de animales es mas reciente y tiene como objetivo mejorar el aprovechamiento del valor nutritivo del alimento, puesto que va a ayudar al equipo enzimático propio del animal. Además, recientemente se ha comprobado que la mayor asimilación de nutrientes en el intestino delgado debido a la adición de enzimas, puede cambiar la composición del sustrato que llega al intestino grueso afectando el perfil de la microbiota que crece en este segmento (Bedford, 2000 citado por Blas C. *et al.*, 2003)

El cuy es un animal fermentador postgástrico, gracias a esta característica biológica en el ciego los compuestos no digeridos son sometidos a un proceso de fermentación por parte de los microorganismos que se encuentran colonizando esta región. Estos microorganismos pueden degradar los compuestos indigeribles, ya que poseen las enzimas capaces de desdoblar estos componentes y así poder ser utilizados; sin embargo, no se tiene información sobre las características, ni bajo qué condiciones actúan las enzimas bacterianas que se encuentran en el ciego de esta especie.

La caracterización de la actividad de las enzimas bacterianas localizadas en el ciego del cuy nos ayudaría a entender con mayor claridad la degradación de los alimentos que llegan al ciego del cuy, y el posible potencial que tengan estas bacterias. Conocimiento que nos serviría de base para la elaboración de estrategias alimentarias, que permitirían obtener una mejor eficiencia alimenticia en esta especie. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad de las enzimas bacterianas hidrolíticas en la región cecal del cuy, al final de la etapa de engorde, en diferentes condiciones de pH y temperatura.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.EL CUY

II.1.1. Historia y evolución

El cuy es una especie originaria de América del Sur, con presencia a lo largo del eje de la cordillera de los Andes en los territorios de Venezuela, Colombia, Ecuador, Bolivia, noreste de Argentina y norte de Chile (Cabrera, 1953). En nuestro país se encuentra distribuido en zonas por debajo de los 4,500 metros sobre el nivel del mar (msnm), y a pesar de su estrecha relación con los Andes, también se han logrado desarrollar en regiones de Costa y Selva alta (Noonan, 1994; Chauca, 1997; FAO, 2001).

En cuanto al origen de esta especie, se cree que el cuy o cobayo como lo conocemos en la actualidad es la forma doméstica de roedores salvajes que habitaban en las llanuras de Sudamérica (*Cavia aperea aperea*, *Cavia aperea fulgida* o *Cavia aperea schudii*), existiendo alrededor de 14 especies dentro del género *Cavia sp* (Salinas, 2002).

El hábitat del cuy silvestre, según la información zoológica, es aún más extensa, habiéndose registrado su presencia desde América Central, el Caribe y las Antillas hasta el sur del Brasil, Uruguay y Paraguay. La especie *Cavia aperea tschudii* se distribuye en los valles interandinos del Perú, Bolivia y noroeste de la Argentina; mientras que *Cavia aperea aperea* tiene una

distribución más amplia que va desde el sur del Brasil, Uruguay hasta el noreste de la Argentina (Cabrera, 1953).

Existen pruebas que demuestran que el cuy fue domesticado hace 2500 a 3600 años. En el templo del Cerro Sechín (Perú), se encontraron abundantes depósitos de excretas de cuy y en el primer período de la cultura Paracas (250 a 300 a.C), hay indicios que los pobladores de esta cultura se alimentaban con carne de cuy. Para el tercer periodo de esta cultura (1400 d.C), casi todas las casas tenían un cuyero (Tello, citado por Moreno, 1989). También se han encontrado cerámicas, como en los huacos Mochicas y Vicus, que muestran la importancia que tenía este animal en la alimentación humana.

Se han encontrado pellejos y huesos de cuyes enterrados con restos humanos en las tumbas de América del Sur, esto demostraría la existencia y utilización de esta especie en épocas precolombinas. Existen datos que refieren que tanto la carne de cuy y la de venado fueron utilizadas por los ejércitos conquistadores en Colombia (Pulgar Vidal 1952, citado por Chauca, 1997).

En el siglo XVI, el cuy fue introducido a España, desde donde se difundió al resto del continente europeo. Y así, el cuy continúa siendo hasta hoy, un producto alimenticio, cultural y religioso muy importante dentro de la cultura andina (Bustamante, 1993; Aliaga, 1995; Rofes, 2000; CEA, 2001).

II.1.2. Características generales del cuy

Los cuyes son roedores que presentan un genotipo compuesto por 32 pares ($2n=64$) de cromosomas, demuestran actividad diurna y nocturna, así como un temperamento nervioso sensible. Fisiológicamente, presentan un periodo de gestación relativamente largo de 59 a 79 días, con una placentación hemocorial igual a la de los roedores, conejos y primates. Es una especie muy prolífica, ya que sus camadas pueden presentar de 1 a 8 crías, pudiendo ser estas destetadas a las 2 semanas de edad (Percy y Barthold, 2001).

Los cuyes nacen anatómicamente bien desarrollados, cubiertos de pelos, ojos abiertos y dientes que les permiten comer alimentos de consistencia sólida

desde su nacimiento. Estos animales también pueden vivir en climas variados, teniendo como promedio de vida 6 años y 8 como máximo, a medida que la edad aumenta la productividad disminuye, estimándose que no es rentable reproducir una hembra más allá de los 18 meses de edad (Orson, 1972; Bustamante, 1993).

En cuanto al pelaje, los cuyes tienen colores variados: blanco, negro, amarillo, caramelo, bayo, etc., y en colores enteros o combinados (Villanueva, 2001; Castro, 2002). Los cuyes se clasifican según su pelaje en cuatro tipos: tipo I, Tipo II, Tipo III y tipo IV.

Se ha logrado identificar tres niveles de producción caracterizados por la función que esta cumple dentro del contexto de la unidad productiva. Los sistemas identificados son: el familiar, el familiar-comercial y el comercial. En el área rural el desarrollo de la crianza ha implicado el paso de los productores de cuyes a través de los tres sistemas (Chauca, 1997; Villanueva, 2001).

En la escala zoológica (Orr, 1966, citado por Moreno, 1989), el cuy se ubica dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

REINO	:	<i>Animal</i>
SUB-REINO	:	<i>Metazoaroa</i>
PHYLUM	:	<i>Vertebrata</i>
SUB-PHYLUM	:	<i>Gnasthosmata</i>
CLASE	:	<i>Mammalia</i>
SUB-CLASE	:	<i>Theria</i>
INFRA-CLASE	:	<i>Eutheria</i>
ORDEN	:	<i>Rodentia</i>
SUBORDEN	:	<i>Hystricomorpha</i>
FAMILIA	:	<i>Caviidae</i>
GENERO	:	<i>Cavia</i>
ESPECIE	:	<i>Cavia porcellus</i>

II.1.3. Utilidad del cuy

II.1.3.1. En la alimentación humana

La carne de cuy es una fuente importante de proteína animal, dado que contiene un 20.3% de proteína, 8.8% de grasa, 0.8% de minerales y 70.6% de humedad; comparativamente representa una buena alternativa alimenticia por los altos niveles proteicos; por esta razón los habitantes de nuestro país, en especial los de la región andina, le dan una preferencia especial dentro de sus actividades festivas, y en los últimos años el consumo de esta carne se ha incrementado a nivel de la costa, influenciado por el fenómeno migratorio hacia las principales ciudades y a la revalorización de un producto tan nutritivo y a la vez tradicional (Aliaga, 1995).

II.1.3.2. En la investigación

Aunque los animales más utilizados son los ratones, ratas y hámsteres, los cuyes son los animales más importantes en los estudios biomédicos debido a que son muy susceptibles a una amplia gama de enfermedades que afectan al hombre. Además, presentan características zootécnicas favorables para este uso, tales como: fácil reproducción, destete temprano, incapacidad para sintetizar vitamina C (Reyes, 2008).

II.1.3.3. Como mascotas

El uso del cuy como mascota es muy común en el mundo, especialmente en los Estados Unidos de América (EUA), Gran Bretaña, Brasil y Suecia, donde existen innumerables clubes de criadores, propietarios de estos animales y concursos de exhibición, donde estos últimos son muy populares en EUA y Europa; y son juzgados de acuerdo a un estándar de perfección de sus características físicas. En estos

concursos, los cuyes son divididos de acuerdo a su raza, variedad, sexo y tamaño. El nombre más común para estas mascotas es “cavy o guinea pig” y su crianza es similar a la de los hámsteres. Como muestra de lo popular que es su crianza en estos países es que existen alimentos comerciales preparados especialmente para ellos (Aliaga, 1995; CEA, 2001).

II.1.4. Importancia socioeconómica

El cuy es considerado como una especie estratégica debido a las siguientes características: calidad de su carne, precocidad, prolificidad y buenos índices de conversión alimenticia. Además, este animal no compite con el ser humano en el uso de granos; como si lo hacen otras especies pecuarias como los cerdos y las aves. (Bustamante, 1993).

En cuanto a la población en Latinoamérica esta se estima en un promedio de 35 millones de cuyes, siendo el Perú el primer productor con 23'240,846 cuyes que habitan mayormente en zonas alto andinas y que coincidentemente son las aéreas del país menos favorecidas socioeconómicamente. Reportes actuales muestran una producción de 17,000 toneladas de carne al año; sin embargo esta es destinada principalmente al autoconsumo (Zevallos, 2001; INIA, 2003).

Se estima que en la actualidad el 74% de población de Lima, la cual asciende a 8'445,211 (INEI, 2007), es potencialmente consumidora de carne de cuy; por lo tanto, existe una demanda insatisfecha debido a la escasa oferta en el mercado. Es así que su crianza es una alternativa viable para incrementar el consumo de proteína de origen animal, generar empleo, disminuir la migración, la importación de productos alimenticios y la extrema pobreza del país, especialmente de las zonas rurales.

II.2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DIGESTIVA DEL CUY

El cuy es un mamífero roedor monogástrico herbívoro que se alimenta principalmente de forraje verde, y según su anatomía gastrointestinal está clasificado como un fermentador postgástrico cecal junto con el conejo y la rata (Van Soest, citado por Gómez y Vergara, 1995) tal como se aprecia en el Cuadro 1. Su comportamiento nutricional se asemeja, de adulto; mas a un poligástrico con procesos de fermentación mixta y capacidad degradadora de celulosa, que a un monogástrico estricto como lo es el cerdo, perro, etc.

Cuadro 1. Clasificación de los animales según su anatomía gastrointestinal propuesta por Van Soest

Clase	Especie	Habito alimentario
1. Fermentadores pre-gástricos		
I. Rumiantes	Vacuno, ovino Antílope, camello	Herbívoro de pasto Herbívoro selectivo
II. No rumiantes	Hámster, ratón de campo Canguro, hipopótamo	Herbívoro selectivo Herbívoro de pasto y Selectivo
2. Fermentadores post-gástricos		
I. Cecales	Capibara Conejo Cuy Rata	Herbívoro de pasto Herbívoro selectivo Herbívoro Omnívoro
II. Colónicos		
○ Saculados	Caballo, cebra	Herbívoro de pasto
○ No saculados	Perro, gato	Carnívoro

Fuente: Van Soest 1983, citado por Gómez y Vergara, 1995

El cuy como todos los mamíferos, ya sean monogástricos herbívoros o poligástricos, tienen una fisiología especial mientras depende de la leche materna. El intestino delgado de todo animal mamífero neonato, posee la capacidad de ser permeable a las proteínas del calostro, es decir permite el paso de las inmunoglobulinas, esta capacidad decrece rápidamente a las pocas horas de nacido (Mc Donald *et al.*, 1981). En poligástricos y monogástricos herbívoros tanto el rumen como el ciego del lactante no está desarrollado plenamente y no son

funcionales mientras el animal consume leche (Morrison, 1977, citado por Ordoñez, 1998). Teniendo en cuenta que el cuy nace en un estado avanzado de maduración, el periodo de lactancia es corto en comparación con otras especies y prácticamente toma los alimentos para adultos desde que nacen (Smith, 1962), ingiriendo forraje y concentrado, con lo cual prepara al ciego para su función digestiva de adulto.

II.2.1. Sistema digestivo del cuy

El proceso de digestión de los cuyes se inicia en la boca con la ingestión de los alimentos y la posterior trituración mecánica y masticación de los alimentos por las piezas dentarias que poseen, las cuales están diseñadas especialmente para estas funciones, teniendo como resultado la reducción del tamaño de partícula de la digesta la cual se mezclará con la saliva (Bustamante, 1993; Sakaguchi, 2003, citado por Quintana, 2009).

La saliva proviene principalmente de tres pares de glándulas bilaterales (submaxilares, sublinguales y la parótida), esta posee 99% de agua y una solución de sales y mucoproteínas. Debido a la presencia de estas últimas, la saliva es un líquido muy viscoso, el cual actúa como lubricante. Gracias a estas características, la saliva participa en la formación del bolo alimenticio el cual será deglutido con facilidad, incrementado de esta manera la superficie de los alimentos para permitir actuar a las enzimas digestivas a su paso por el tracto digestivo (Bondi, 1988; Church, *et al.*, 2009). El bolo alimenticio llega al estómago a través del esófago.

El cuy posee un estómago glandular simple, el cual sirve como reservorio de los alimentos, para controlar el paso al intestino delgado, y para iniciar la digestión enzimática principalmente de las proteínas, aunque el paso del alimento por este órgano es muy rápido (Rigoni *et al.*, 1993). Externamente el estómago del cuy es un saco piriforme, de una coloración rosada y de textura lisa. La demarcación externa entre la parte glandular y no glandular no se aprecia. El estómago posee cuatro regiones: cardial, fundus, cuerpo y pilórica (Bondi, 1988; Ghoshal y Bal, 1989).

El epitelio del estómago no glandular es escamoso estratificado queratinizado. La mucosa del estómago glandular está revestido por un epitelio columnar simple, la secreción de moco (mucina gástrica) por las células epiteliales forman una capa protectora de la mucosa gástrica. Estas células secretoras producen conjuntamente, ácido clorhídrico, enzimas y mucina gástrica (Bondi, 1988; Ghoshal y Bal, 1989). En los estudios realizados por Maxhua y Cook (1990), realizaron las mediciones del sistema digestivo de cuyes criollos de la microregión de Cangallo, teniendo las siguientes medidas del estómago de cuyes hembras 7.3x4.01 cm y machos 6.9x3.93 cm.

El intestino delgado (ID) es el lugar principal donde se realiza la digestión y absorción de los nutrientes de la dieta. El ID es un tubo muscular situado entre los esfínteres pilórico e íleocecal; convencionalmente se divide en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon, como se aprecia en la figura 1. Maxhua y Cook (1990), reportaron las medidas del ID de cuyes criollos machos y hembras, las cuales fueron 183 cm y 193 cm, respectivamente.

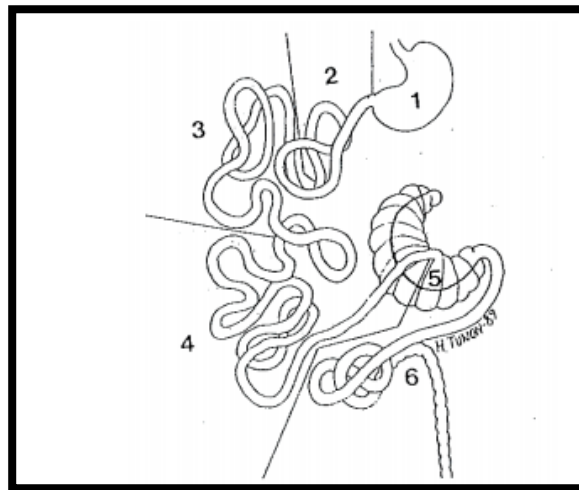


Fig.1 Aparato digestivo del cuy (*Cavia porcellus*) 1) Estómago, 2) Duodeno, 3) Yeyuno, 4) Íleon, 5) Ciego, 6) colon. Adaptado de Samuelsson, 1991

Los alimentos, parcialmente digeridos, luego de abandonar el estómago ingresan al ID, donde se mezclan con las secreciones del duodeno, hígado y páncreas, en esta región, las glándulas de Brünner producen una secreción alcalina, que sirve de

lubricante además de proteger la pared del duodeno del ácido clorhídrico proveniente del estómago (Mc Donald *et al.*, 1981; Bondi, 1988). A medida que los alimentos llegan al duodeno, la pared intestinal comienza una complicada serie de contracciones, en ambas direcciones, que mezclan los alimentos con los jugos gástricos, los ponen en contacto con la mucosa donde se realiza la absorción y empujan el quimo hacia adelante; todo este proceso toma aproximadamente dos horas (Chauca, 1995; Bondi, 1988).

Continuando el ID se localiza el intestino grueso (IG) el cual se compone del ciego, colon y recto. El IG es más corto que el ID, pero tiene un diámetro considerablemente mayor. El ciego es un órgano muy importante en el cuy, ya que junto al colon proximal pueden contener hasta el 65% de la digesta, además la retención de la digesta es más prolongada que en ratas y conejos, El ciego del cuy posee capacidad fermentativa por la compleja flora que lo habita (Snipes, 1982 citado por Quintana 2009; Sakaguchi *et al.*, 1992; Johnson-Delaney, 2006, citado por Quintana, 2009).

A pesar de los procesos ocurridos en el estómago y el ID, existen componentes de los alimentos resistentes a estas enzimas, estos componentes no digeridos llegan al IG. Las secreciones del IG se componen de un líquido acuoso carente de enzimas, que contiene bicarbonato sódico y mucina, que lubrica los restos de los alimentos a su paso por el intestino grueso, así como la superficie interna. La digestión en el IG tiene lugar como resultado de la actividad microbiana, realizada por una población microbiana semejante a la existente en el rumen. La actividad microbiana es especialmente intensa en la degradación de la celulosa (Bondi, 1988).

La digestión fermentativa se lleva a cabo en aproximadamente 48 horas, producto de este proceso se obtienen ácidos grasos de cadena corta, vitaminas del complejo B y proteína microbiana, pero sólo se absorben a este nivel los ácidos grasos volátiles, vitaminas y agua (Rico y Rivas, 2003, citado por Quintana, 2009).

Por otro lado, los cuyes desarrollan la cecotrófia, como un mecanismo de compensación biológica que le permite el máximo aprovechamiento de sus productos metabólicos, ante la desventaja nutricional que representa el hecho de que

gran parte de la digestión ocurra en porciones posteriores del tracto gastrointestinal (Chauca y Saravia, 1976). La actividad cecotrófica es poco estudiado y es por esta que el cuy puede aprovechar las proteínas bacterianas presentes en el ciego, así como la reutilización del nitrógeno proteico y no proteico que no haya sido digerido en el ID, con índices diferenciales de digestibilidad (Hidalgo, 2000).

Para que la población microbiana cecal se mantenga constante y sea eficiente la digestión fermentativa, el cuy desarrolló el mecanismo de separación colónica (Holtenius y Bjornhag, 1985; Sakaguchi, 2003), el cual consiste en movimientos antiperistálticos en los surcos del colon proximal que retornan los microorganismos desde el colon proximal hacia el ciego, resultando en una retención selectiva de microorganismos.

II.3.MICROORGANISMOS DEL TRACTO DIGESTIVO DEL CUY

Una vez establecida, la microbiota gastrointestinal normal está compuesta por dos grupos: la microbiota indígena y la microbiota transitoria (Mc Donald, 2000). La microbiota indígena de una determinada especie animal está constituida por microorganismos que habitan en todos los integrantes de esa comunidad, en el caso de animales de abasto, es la microbiota presente en los animales de un hato o región geográfica (Rosmini, 2004). Ésta microbiota está siempre presente en los individuos adultos, crece en anaerobiosis en el tracto gastrointestinal colonizando nichos determinados, está asociada íntimamente al epitelio de la mucosa y es capaz de mantener estable al ecosistema gastrointestinal (Rosmini, 2004). La microbiota indígena es la que mayor impacto tiene cuando se caracteriza a su ecosistema (Mc Donald, 2000; Rosmini, 2004).

La microbiota transitoria está formada por microorganismos no siempre presentes en todos los individuos de la comunidad; en general proviene del agua, los alimentos y de otras partes del cuerpo, pero utilizan el tracto gastrointestinal sólo en forma temporal (Raibaud, 1992; Rosmini, 2004).

Al colonizarse el tracto gastrointestinal de los animales, este se protege en forma natural por la microbiota indígena que lo coloniza a partir del momento de su nacimiento, se adapta al ambiente y dificulta la colonización del lumen por otros microorganismos, en especial por patógenos (Vaughan *et al.*, 1999).

Este se transforma en un ecosistema complejo, ya que está formado por elementos bióticos tales como microorganismos indígenas, transitorios, células del epitelio intestinal y constituyentes de la dieta o componentes abióticos; tales como la saliva, las secreciones o excreciones de los diferentes órganos del tubo digestivo, las enzimas, las hormonas, entre otros (Mc Donald, 2000). El equilibrio de este ecosistema depende en gran medida de la microbiota intestinal indígena, muy estable en individuos adultos sanos y esenciales para el mantenimiento de la salud del hospedero (Pascual *et al.*, 1996; Rosmini, 2004).

La microbiota gastrointestinal de los mamíferos posee una alta densidad poblacional, diversidad y complejidad (Zoetendal *et al.*, 2004). La primera microflora intestinal indígena que se estabiliza en el intestino es una colección muy compleja de cerca de 10^{14} microorganismos consistentes en 400 diferentes tipos de bacterias. Dentro de tan complejo sistema existen muchas interrelaciones entre los diferentes microorganismos y entre los microorganismos y el hospedero.

A pesar de esta variabilidad, la flora rápidamente se establece como una población muy estable. La composición de la flora es determinada por el hospedero y por factores microbianos (Fuller, 1989; Fuller, 1997) y aunque hay muchas bacterias que pueden sobrevivir y crecen en el tracto intestinal, hay muchas que no pueden hacerlo.

En estado salvaje, el animal bebe toma su flora intestinal principalmente de su madre por rutas directas e indirectas. Sin embargo, los métodos modernos de crianza animal frecuentemente restringen el acceso que el infante tiene con su madre y evita que adquiera todos los microbios característicos complementarios.

Como se mencionó anteriormente, los mamíferos se caracterizan por poseer una microflora bacteriana intestinal compleja, así, tanto el conejo como el cuy poseen un colon y un ciego con una población compleja, constituida principalmente por bacterias anaeróbicas Gram (+) del tipo *Lactobacillus*, y algunas bacterias anaerobias Gram (-) como *Bacteroides* spp., muy sensibles al efecto de los antibióticos (Ordoñez, 2005).

En el ciego se han encontrado bacterias celulolíticas, pectinolíticas y xilanolíticas (Boulaouf *et al.*, 1991), ureolíticas (Salses *et al.*, 1976, citado por Ordoñez, 2005; Hill, 1983; Crociani *et al.*, 1984; Forsythe y Parker, 1985), proteolíticas (Emaldy *et al.*, 1977, citado por Ordoñez, 2005) y amilolíticas (Padilha *et al.*, 1995). La actividad metabólica de la flora está relacionada a la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y amonio (NH_3). En la producción de AGV es predominante el acetato (60 a 80 mmol/100 mmol) seguido de butirato (8 a 20 mmol/100 mmol) y por último el propionato (3 a 10 mmol/100 mmol).

Es necesario conocer que la óptima digestión fermentativa depende del bienestar y equilibrio de la flora cecal, pues cualquier factor que la altere podría tener efectos desfavorables sobre el crecimiento, como por ejemplo, el número de bacterias presentes en el colon y la existencia de bacterias dominantes y subdominantes, ya que estas interacciones ocurren comúnmente, así como también, la competencia por nutrientes o la producción de moléculas antibióticas (Bourliux, *et al.*, 2002, citado por Ordoñez, 2005).

Para desarrollar sistemas de alimentación que permitan la implantación de una flora estable, compatible con la salud del animal, es necesario: caracterizar la microbiota del tracto intestinal y las especies patógenas; establecer las interacciones entre las distintas especies patógenas, caracterizar los mecanismos de exclusión competitiva entre poblaciones patógenas y no patógenas (Ordoñez, 2005).

Los mecanismos por los que una especie no patógena predomina sobre otra patógena son complejos, de acuerdo con Hampson *et al.* (2001) hay diversas rutas en las que se puede producir esta competencia, así tenemos: diferencias de

crecimiento a partir de un sustrato específico; diferencias en la eficacia de colonización de la mucosa y; producción de sustancias inhibitoras del desarrollo de patógenos (ácidos grasos de cadena corta, ácido sulfhídrico, sales biliares desconjugadas y bacteriocinas).

En los trabajos de Penney *et al.* (1986), Padilla *et al.* (1996), Canzi *et al.* (2000) se describe la microbiota del tracto intestinal del conejo. Indican que esta se desarrolla fundamentalmente en el ciego (10^{10} - 10^5 bacterias /g de digesta). Penney *et al.* (1986) también han descrito la presencia de microorganismos en el estómago (10^3 – 10^5 bacterias/g digesta), aunque transcurridos 6 o 7 horas de la ingestión de cecotrofas las células no son viables. Dentro de las más de doscientas especies descritas, el género *Bacteroides* junto con el género *Clostridium* parecen ser los predominantes en el ciego de los animales adultos sanos (Penney *et al.*, 1986; Canzi *et al.*, 2000). Sin embargo, algunas especies aisladas del género *Bacteroides* puede comportarse también como importantes patógenos u oportunistas (*Bacteroides fragilis*). Otros géneros importantes son los *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Enterobacter* (Bonnafeous y Raynaud, 1970; Govet y Forty, 1979; Forhythe y Parker 1985; Penney *et al.*, 1986; Cortez *et al.*, 1992; citados por De Blas *et al.*, 2002).

El equilibrio entre las distintas especies de bacterias en el ciego es inestable y depende de varios factores. Carrizo (2003, citado por Ordoñez, 2005), considera como el principal factor de la calidad de nutrientes que llegan al ciego. Como se mencionó anteriormente, la flora cecal vive del alimento no absorbido en el ID, por lo que si al ciego llegan una gran cantidad de proteínas estas serán aprovechadas por los Clostridios que al desaminar las proteínas provocarán un aumento de amoníaco y una subida del pH, favoreciendo el crecimiento de mas Clostridios pudiendo desencadenar una enterotoxemia.

En el caso de llegar una excesiva cantidad de almidones, se favorecerá el desarrollo de las bacterias amilolíticas. Esto provocará una acidosis y fuerte caída del pH, ocasionando fuertes diarreas especialmente en gazapos jóvenes que no producen suficiente amilasa pancreática. La digestión intestinal del almidón puede ser completa en animales adultos llegando al 98% en las dietas con un 25% de

almidón procedente de cebada y maíz. En animales jóvenes con capacidad amilásica menor que la del adulto, parte del almidón podría quedar sin digerir (Merino y Carabaño, 1992, citado por Ordoñez, 2005; Amber, 1997). Peeters *et al.* (1993) observaron, en animales infectados con *C. spiriforme*, una mayor incidencia de enterotoxemia cuando los animales se alimentaban con una dieta con 25.8% de almidón procedente de maíz que cuando el nivel de almidón de la dieta se reducía al 13,1%. La escasez de fibra indigerible o de fibra larga en el alimento, da lugar a una reducción del peristaltismo intestinal y como consecuencia una mayor permanencia del alimento en el ciego y aumento de fermentaciones no deseadas que ocasionan problemas digestivos en conejos.

II.4.ENZIMAS HIDROLÍTICAS O HIDROLASAS

La degradación de materia orgánica en el tracto digestivo de animales postgástrico (conejo, cuyes) involucran un número de reacciones hidrolíticas las cuales son catalizadas por enzimas de origen endógeno y/o bacteriano. Generalmente se asume que la actividad hidrolítica y el volumen digerido se correlacionan positivamente con la eficiencia de la digestión. El valor nutricional de las dietas de cuyes podría ser mejorado mediante la suplementación de enzimas, como se sugiere para otras especies (Yu y Tsen, 1993).

Las enzimas son proteínas capaces de catalizar reacciones bioquímicas específicas con un gasto mínimo de energía. La utilización de enzimas ha experimentado una gran expansión y actualmente se emplea en procesos industriales como detergentes, papeles, tejidos, etc. así como en el sector de comidas y bebidas (Sheppy, 2001, citado por Nicodemus *et al.*, 2003).

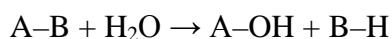
En función de su acción catalítica específica, las enzimas se clasifican en 6 clases. Las hidrolasas se encuentran en la clase 3 según la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) y International Union Of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Clasificación de las enzimas según la International Union of Pure and Applied Chemistry y International Union Of Biochemistry and Molecular Biology.

<u>Clasificación</u>	<u>Tipo de reacción catalizada</u>
1. Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación-reducción
2. Transferasas	Transferencias de grupos funcionales
3. Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
4. Liasas	Eliminación de grupo para formar enlaces dobles
5. Isomerasas	Isomerización
6. Ligasas	Formación de enlaces con ruptura de ATP

Fuente: Schlegel, 1993; Shoham *et al.*, 1999.

Una hidrolasa es una enzima capaz de hidrolizar un enlace químico. A este grupo de enzimas se puede considerar una clase especial de transferasas en el que el grupo dador se transfiere al agua. La siguiente reacción química es catalizada por una hidrolasa.



La reacción generalizada implica la rotura hidrolítica de enlaces C-O, C-N, O-P y C-S (York, 2004).

II.4.1. Las amilasas (E.C. 3.2.1)

Las amilasas tienen como sitio de acción los enlaces glicosídicos α 1-4 y α 1-6 del almidón. Durante la degradación del almidón (fig. 2), actúan diferentes enzimas como la α -amilasa que hidroliza los enlaces α 1-4 de amilosa. Las β amilasas, por su parte, actúan sobre los extremos no reductores de la amilosa y la amilopectina, hidrolizando los enlaces glicosídicos alternantes. La pululanasa o isoamilasa hidroliza los enlaces α 1-6 glicosídicos, liberando las ramificaciones de la amilopectina. Durante el proceso de degradación del almidón se generan moléculas de maltosa que son hidrolizadas por la maltasa generando glucosa (Alexander, 1980).

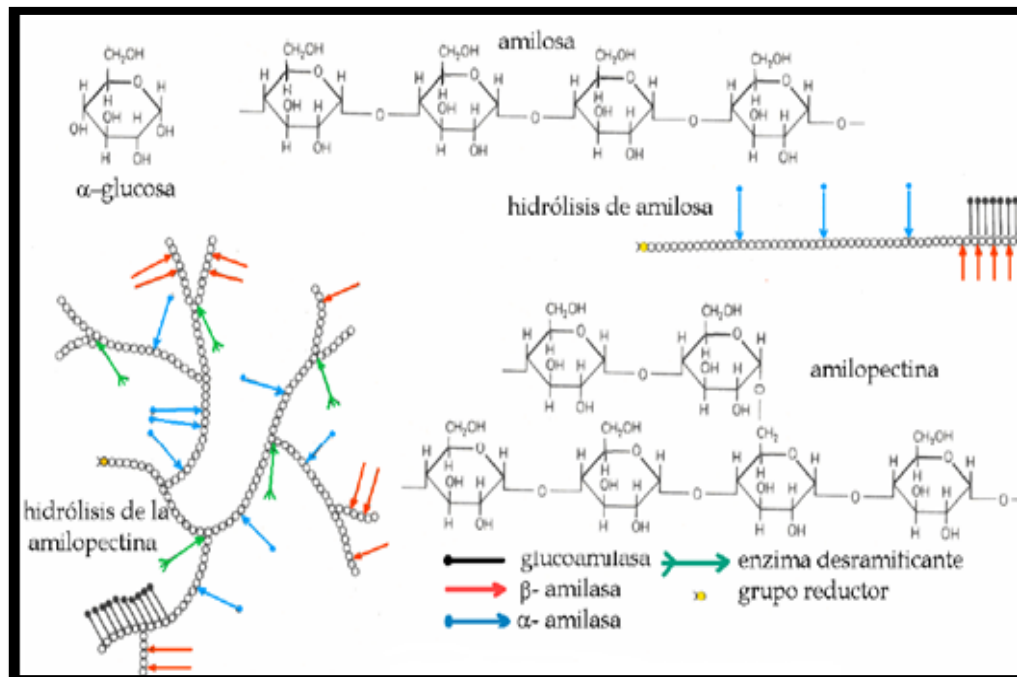


Figura 2. Degradación del almidón (Schlegel, 1993)

La α -amilasa ataca los enlaces 1,4- α -glucosídicos aún en el centro de la cadena, por lo que se la conoce como endoamilasa, produciendo glucosa, maltosa y oligómeros de 3 a 7 unidades. Está presente en plantas, animales y microorganismos. La viscosidad de la solución de almidón y el color de su reacción con yodo se reducen rápidamente durante la hidrólisis. Producen amilasas muchos hongos del suelo así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* entre otras.

La β -amilasa, presente en plantas y bacterias, también degrada los enlaces 1,4- α -glucosídicos pero comienza su acción por el extremo libre no reductor del almidón, liberando maltosa mientras continúa el color frente al yodo. La hidrólisis se detiene en los puntos de ramificación de la amilopectina y el residuo se conoce como dextrina límite (Madigan *et al.*, 2003). La pululanasa o isoamilasa hidroliza los enlaces 1,6- α -glucosídicos quitando las ramas de la amilopectina o las dextrinas. La maltasa hidroliza la maltosa a glucosa (Alexander, 1980). Si estas enzimas acompañan a las anteriores se logra una degradación total del almidón.

Las amilasas son inducibles, pero su producción depende del tipo de almidón empleado. Las α -amilasas de *Bacillus stearothermophilus* y *B. licheniformis* son termo estables así como las excretadas por algunos clostridios termófilos, los que también excretan pululanasa (Schlegel, 1993).

II.4.2. Las celulasas (E.C. 3.2.1)

La celulosa es el componente básico de los vegetales y consta de unidades de β -Dglucopiranosas reunidas por enlaces 1,4-glicosídicos. La molécula de celulosa tiene regiones cristalinas alternadas con zonas amorfas. La insolubilidad de la celulosa y su alta resistencia mecánica se debe a la presencia de puentes de hidrógeno inter e intramoleculares y a fuerzas de Van der Waals (Schlegel, 1993).

La hidrólisis de la celulosa es catalizada por un sistema constituido por tres enzimas:

- endo- β -1,4-glucanasa que ataca los enlaces β -1,4 en las regiones amorfas internas de la macromolécula dando largos fragmentos solubles (oligosacáridos).
- exo- β -1,4-glucanasa que separa el disacárido celobiosa desde los extremos de la molécula.
- β -glucosidasa que hidroliza la celobiosa con formación de glucosa (Muller, 1988).

La hidrólisis de la celulosa intacta se cumple mejor cuando estas tres enzimas operan al unísono, como ocurre en el celulosoma de *Clostridium thermocellum* y en otros microorganismos, como se muestra en el cuadro 3 (Shoham *et al.*, 1999).

Cuadro 3. Algunos microorganismos que degradan la celulosa (Schlegel, 1993; Shoham *et al.*, 1999)

Organismos eucarióticos				
Quitridiomycetos	Hongos mitospóricos	Ascomycetos	Basidiomycetos	
<i>Neocallimastix</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Chaetomium</i>	<i>Coprinus</i>	
<i>Orpinomyces</i>	<i>Botrytis</i>		<i>Fomes</i>	
<i>Piromonas</i>	<i>Fusarium</i>		<i>Pleurotus</i>	
<i>Sphaeromonas</i>	<i>Humicola</i>		<i>Polyporus</i>	
	<i>Myrothecium</i>		<i>Trametes</i>	
	<i>Trichoderma</i>		<i>Rhizoctonia</i>	
Organismos procarióticos				
Mixobacterias	Bacterias deslizantes	Bacterias aerobias	Bacterias anaerobias	Actinomicetos
<i>Archangium</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Cellulomonas</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Polyangium</i>	<i>Sporocytophaga</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Sorangium</i>			<i>Clostridium</i>	<i>Streptosporangium</i>
			<i>Eubacterium</i>	
			<i>Ruminococcus</i>	

II.4.3. Las proteasas (EC 3.4)

Las enzimas proteolíticas (comúnmente llamadas proteasas) pertenecen al grupo de las hidrolasas (Guadix *et al.*, 2000) ya que degradan las cadenas peptídicas de las proteínas-sustrato (Carrera, 2003), hidrolizando los enlaces peptídicos (fig. 3), con diferentes grados de intensidad y de selectividad. Un enlace peptídico es la unión que se realiza entre el grupo ácido de un aminoácido con el grupo amino de otro, con la consecuente eliminación de una molécula de agua (Guadix *et al.*, 2000).

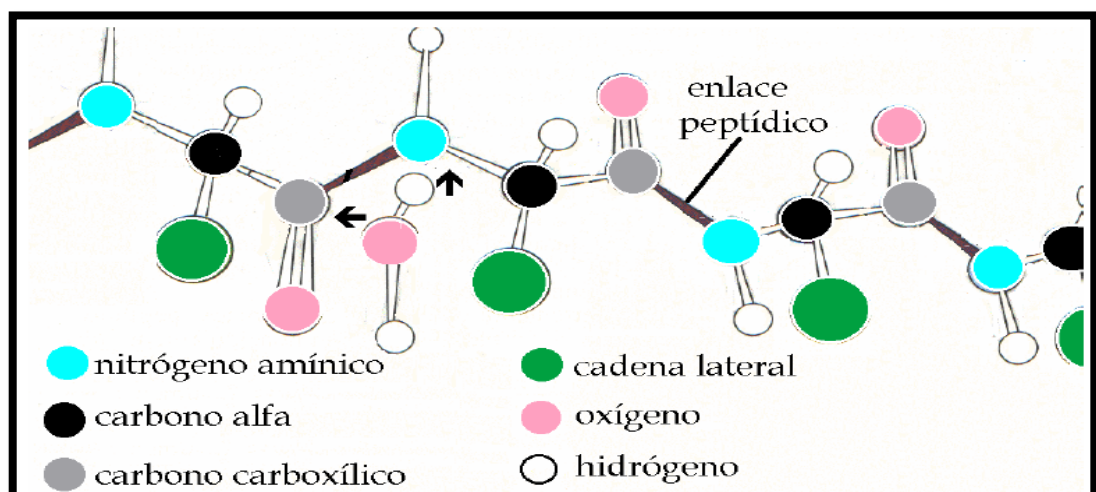


Figura 3. Hidrólisis del enlace peptídico (Doolittle, 1985)

En lo que se refiere al término proteasa, existen criterios encontrados en su definición. Este término, por tanto, puede ser sinónimo del término péptido hidrolasa, pues éste incluye todas las enzimas que rompen enlaces peptídicos. Las proteasas constituyen uno de los grupos funcionales más extensos de proteínas, con más de 560 miembros descritos (Barret, 1980; Barret *et al.*, 1998,; Supuran *et al.*, 2002).

Hartley (1969) clasificó a las enzimas proteolíticas de acuerdo con el aminoácido o metal que posean en su sitio activo en: Serín-proteasas, tiol-proteasa, metalproteasas y proteasas ácidas.

Las proteasas excretadas por los microorganismos producen aminoácidos y oligopéptidos al hidrolizar de las uniones peptídicas. Los péptidos son hidrolizados por las exo- y endo-peptidasas. Las exopeptidasas se dividen en dos grupos: las que comienzan su acción por el enlace peptídico adyacente al grupo amino terminal y las que lo hacen por el cercano al carboxilo terminal. Las otras hidrolizan los enlaces del interior de la cadena y son muy específicas, como por ejemplo la acción hidrolítica de la tripsina usada en la producción de peptonas, ocurre solamente si el aminoácido que aporta el grupo carboxilo en la unión peptídica es lisina o arginina (Schlegel, 1993).

II.4.4. Las lipasas (EC 3.1.1.3)

Dentro de la amplia gama de enzimas hidrolíticas, se encuentran aquellas que catalizan la hidrólisis del enlace éster: las esterasas. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en la naturaleza y están presentes en los procesos metabólicos degradativos de algunas plantas y animales, dichas enzimas son producidas por un gran número de microorganismos (Schmid y Verger, 1998).

Dentro de las esterasas se diferencian aquellas que hidrolizan esteres carboxílicos o carboxiestereasas como son las lipasas, las que hidrolizan esteres tiolicos o tioesterasas como la acetilCoA hidrolasa, y las que hidrolizan

monoesteres del ácido fosfórico (Colowick y Kaplan, 1955; Lehninger, 1979; Chavez *et al.*, 1990).

Las lipasas o glicerol éster hidrolasas han sido diferenciadas de las esteras, sobre la base de su relativa especificidad preferencial. Los sustratos naturales para las lipasas son aceites y grasas, como los triglicéridos de ácidos grasos de cadena larga, es decir hidrolizan triglicéridos a ácidos grasos y glicerol, bajo ciertas condiciones catalizan la reacción inversa, mientras que las esterasas actúan sobre ésteres simples de ácidos de bajo peso molecular (Colowick y Kaplan, 1955; Pokomy *et. al.*, 1994). En la figura 4 se muestra el mecanismo de acción de las lipasas.

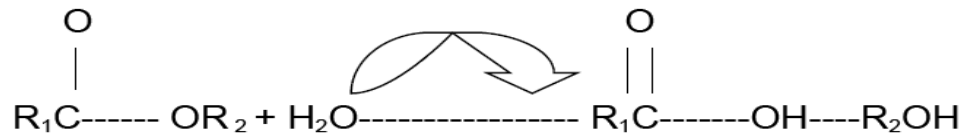


Figura 4. Mecanismo de acción de las lipasas. (Arpigny y Jaeger, 2000)

Algunas lipasas son también capaces de catalizar reacciones de transesterificación e hidrólisis enantioselectivas (Balcao y Malcata, 1996; Pokomy *et. al.*, 1994).

Las lipasas están ampliamente distribuidas en las plantas y los animales, son también producidas en forma endógena y exógena por muchos microorganismos naturales o que han sido manipulados genéticamente (Balcao y Malcata, 1996; Bornscheuer *et. al.*, 1994).

II.5.UTILIZACIÓN DE LAS ENZIMAS

La utilización de enzimas ha experimentado una gran expansión y actualmente se emplea en procesos industriales como detergentes, papeles, tejidos, etc. así como en el sector de comidas y bebidas (Sheppy, 2001, citado por Nicodemus *et al.*, 2003).

La inclusión de enzimas en la dieta de animales es mas reciente y tiene como objetivo mejorar el aprovechamiento del valor nutritivo del alimento, puesto que va a ayudar al equipo enzimático propio del animal. Además, recientemente se ha comprobado que la mayor asimilación de nutrientes en el ID, debido a la adición de enzimas, puede cambiar la composición del sustrato que llega al IG afectando el perfil de la microbiota que crece en este segmento (Bedford, 2000 citado por Blas C. *et al.*, 2003)

Los preparados enzimáticos utilizados como aditivos en la alimentación animal actúan a nivel del sistema digestivo, ejerciendo diferentes acciones como son eliminar factores antinutritivos del alimento, aumentar la digestibilidad de determinados nutrientes, complementar la actividad de las enzimas endógenas de los animales y reducir la excreción de ciertos componentes (fósforo y nitrógeno). Los preparados enzimáticos son eficaces si se utilizan en condiciones idóneas. Un punto fundamental para entender la función de las enzimas es la especificidad que tiene cada enzima por un sustrato o un grupo de sustratos determinado. Por ello, las preparaciones enzimáticas deben estar perfectamente caracterizadas y ser utilizadas únicamente en aquellas raciones que contengan sustratos adecuados. Otro punto fundamental es que las enzimas son proteínas relativamente termolábiles, hecho que debe tenerse en cuenta a la hora de elaborar los preparados enzimáticos y de aplicarlos a la raciones. (Ordoñez, 2005).

Varias enzimas y paquetes de enzimas han sido desarrollados para aumentar la digestibilidad de la dieta, la disponibilidad de energía, proteínas y ácidos grasos. Dichas enzimas son propiamente orientadas a mejorar la eficiencia de la utilización de monogástricos, principalmente cerdos y aves (Arias, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. LUGAR DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición (CIBN) de la Facultad de Medicina Humana (FMH) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM) en los meses de marzo a diciembre del 2010.

III.2. TAMAÑO DE MUESTRA

Este estudio descriptivo tuvo como tamaño muestral cinco cuyes machos (Slande y Hintz 1982; Maraunek y Vovk, 1995) de la raza Andina, procedentes del Centro de Investigación Instituto Veterinario de Investigación Tropicales y de Altura (IVITA)- Mantaro (Junín).

Los cuyes fueron diagnosticados clínicamente sanos, estos fueron seleccionados al final del periodo de engorde (aproximadamente 70 días de edad). Los cuales fueron alimentados con pastos asociados (alfalfa y trébol rojo) y subproducto de trigo (afrecho). El peso promedio de los animales fue de 1022 g (Apéndice 1). Se sacrificó a los animales sin previo ayuno mediante el degolle y sangrado total.

III.3. COLECCIÓN DE MUESTRAS

Luego del sangrado, se procedió a la apertura del animal a través de la línea alba para exponer el sistema digestivo e identificar el ciego. Una vez identificado el ciego, se realizó un piquete con una tijera estéril y se recolectó el contenido cecal con una espátula estéril. El contenido cecal fue colocado en tubos Falcón de 50mL y almacenado a -20°C en congelación, las muestras se procesaron dentro de los 7 días siguientes.

III.4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El contenido cecal de cada uno de los cinco cuyes se procesó de manera individual. Se colocó 6g de contenido cecal con 24 mL de buffer fosfato de sodio (50 mM pH7) en un vaso de precipitado de 100mL y se homogenizó con el agitador magnético refrigerado a 4°C por 2 horas. Este homogenizado se llevó al equipo de sonicación, donde se expuso a la muestra a sonicación por cinco tiempos, con una duración de 10 segundos cada uno.

El contenido de los vasos de precipitado se vertió en tubos de centrifuga y se colocaron en una centrífuga refrigerada a 10,000 x g por 10 minutos a 4°C. Los precipitados se lavaron dos veces con buffer fosfato de sodio (50 mM pH 7) y se resuspendieron al 40% p/v en el mismo buffer. Los restos celulares se removieron por centrifugación (20,000 x g por 30 minutos) a 4°C. Se tomó el sobrenadante, el cual era un extracto libre de células, se guardaron en crioviales a congelación para los posteriores ensayos de actividad enzimática.

III.5. CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS

Las actividades de la enzimas cecales (EC) se expresaron como actividad específica (U/mg proteína) y se realizaron por triplicado.

III.5.1. Actividad amilolítica y celulolítica

Para medir la actividad amilolítica y celulolítica de las EC, el concentrado enzimático cecal (CEC) fue sometido a un pre-tratamiento. Se

colocó en un tubo de ensayo 1 mL de sustrato, con 0.1 mL de CEC y 0.4 mL de soluciones tampón.

En el caso de la actividad amilolítica, el sustrato utilizado fue almidón soluble al 1% en Tris-HCl, 50 mM, pH7.5. Para la actividad celulolítica se utilizó el sustrato Carboximetil Celulosa (CMC) a una concentración de 1.5mg/mL en fosfato de sodio 0.05M, pH 7. Para medir ambas actividades se incubó tanto el CEC, el sustrato y solución tampón. Se utilizaron 3 soluciones tampón de diferente pH, los cuales fueron: a pH 5 (acetato de sodio 50mM), pH 7 (fosfato de sodio 50mM) y pH 9 (carbonato de sodio 50mM). La incubación se realizó por un periodo de dos horas en baño maría a 20°C, 30°C y 40°C.

La actividad enzimática se midió por triplicado con la técnica del 3,5 ácido di-nitro-salicílico (DNS) modificado, descrito por Miller (1959). La actividad se midió por la aparición del producto, es decir por la concentración de azúcares reductores.

Para determinar la concentración de azúcares reductores, se adicionó en tubos 0.25mL de la muestra sometida al pre-tratamiento y se adicionó 0.25 mL de reactivo DNS, luego los tubos se colocaron a ebullición durante 5 minutos y pasado el tiempo de ebullición se sumergió rápidamente en un baño de hielo durante 5 minutos, a continuación se adicionó a cada tubo 2.5mL de agua bidestilada y se procedió a leer en un espectrofotómetro a 540nm.

Se preparó una curva estándar de glucosa (Apendice 2) en la que se usó 0.25mL de reactivo DNS más 2.75mL de agua bidestilada. Las concentraciones de glucosa fueron conocidas las cuales comprenden entre 0.5 a 2g/L. Esta curva estándar de glucosa sirvió para cuantificar azúcares reductores (glucosa) producidos por la actividad amilolítica y celulolítica.

Las actividades enzimáticas equivalentes a almidón y celulosa se definieron como la cantidad de glucosa liberado en g/L respectivamente.

III.5.2. Actividad proteolítica

Para medir la actividad proteolítica de las EC se ensayó la técnica de la azocaseína (Secades, 1999), por triplicado. La actividad se midió por la aparición del producto, es decir los péptidos coloreados productos de la hidrólisis del sustrato, la azocaseína (SIGMA).

La azocaseína se preparó a 3 pH diferentes, las cuales fueron las siguientes: pH 4 (acetato de sodio 50mM), pH 7.6 (buffer Tris-HC (25mM), conteniendo MgCl_2 , concentración final 5 mM) y pH 9 (carbonato de sodio 50mM).

La técnica de la azocaseína consiste en la adición de 12 μL del CEC a 480 μL de azocaseína, esta mezcla fue incubada en baño maría a 20, 30 y 40°C por 30 min. La reacción fue detenida agregando 600 μL de ácido tricloroacético 10% (w/v) y se incubó 30 minutos en hielo, luego se realizó una centrifugación refrigerada (4°C). Se centrifugó a 15,000xg por 10 min. Luego se tomó 800 μL de sobrenadante los cuales fueron neutralizados con 200 μL de NaOH 1.8N, y se midió la absorbancia en el espectofotometro a 420nm.

Una unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad en la cual se da un incremento en A_{420} de 0.01 en 30 min, bajo las condiciones del ensayo.

III.5.3. Actividad lipolítica

Para medir la actividad lipolítica de las EC se utilizó el método espectrofotométrico descrita por Godoy *et. al*, 2009, el cual se modificó. La actividad se midió por la aparición del producto, es decir el cromóforo *p*-nitrofenol.

El sustrato utilizado para esta prueba fue el *p*-nitrofenil caprilato (SIGMA), el cual fue preparado con acetilnitrilo:DMSO (1:1), la concentración final fue 2.5 mM. Además se utilizaron 3 soluciones tampón de diferentes pH,

pH 5 (acetato de sodio 50mM), pH 7 (fosfato de sodio 50mM), pH 9 (carbonato de sodio 50mM).

La técnica consiste en colocar 1.1 mL de solución tampón y luego adicionarle 125 µL de sustrato p-nitrofenil caprilato, e incubarlo en baño maría por 3 minutos a diferentes temperaturas (20, 30 y 40°C) y luego adicionarle 25 µL de CEC, con lo cual se inicia la reacción. Este ensayo se realizó por triplicado. La reacción fue monitoreada por espectrofotometría a 410 nm por 5 minutos.

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima necesaria para formar 1.0 mol de p-nitrofenol por minuto bajo las condiciones de prueba.

III.5.4. Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas del EC, se utilizó la técnica de Lowry *et al.* (1951). La proteína patrón fue la albumina sérica bovina a una concentración de 2.9 g/dL.

La técnica consiste en tomar 0.1 CEC diluido y añadir carbonato de sodio (1M en NaOH 0.25M). Estos reactivos se mezclan bien y se añade el reactivo cúprico (Sulfato de Cobre. 5H₂O 0.1g% en tartrato de Na y K 0.2g%). La mezcla se dejó reposar por 10 minutos. Luego se adiciona el reactivo de Folin – Ciocalteus (1/3). Los reactivos se mezclaron y reposaron por 20 minutos. La absorbancia se midió a 700nm. Esta prueba se realizó por triplicado.

III.6. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos son valores cuantitativos continuos por lo que para su análisis se empleó la estadística descriptiva. Como medida de tendencia central se utilizó la media aritmética y como medida de variabilidad la desviación estándar. Los resultados se expresan en gráficos de dispersión de acuerdo a su naturaleza. Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba de t- Student.

IV. RESULTADOS

IV.1. ACTIVIDAD CELULOLÍTICA

La actividad celulolítica de las EC de cuyes fue medida a diferente pH y temperatura. Los datos individualizados se encuentran en el Apéndice 3. En el cuadro 4, se muestran los promedios de las actividades celulolíticas, expresadas como actividad específica (U/g proteína). La temperatura afectó la actividad celulolítica de las EC. Así mismo, el pH afectó la actividad celulolítica de las EC pero sólo a la temperatura de 20°C y 30°C, mas no a 40°C.

Cuadro 4: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.

Temperatura °C	pH		
	5	7	9
	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)
20	13.2±2.2 ^{a,1}	17.3±2.2 ^{c,2,3}	17.7±2.2 ^{d,3}
30	15.4±2.7 ^{a,4}	19.6±3.2 ^{c,4,5}	20.8±3.2 ^{d,e,5}
40	20.9±3.5 ^{b,6}	21.4±3.6 ^{c,6}	21.8±3.2 ^{e,6}

a, b, c, d, e: Promedio al mismo pH y diferentes temperatura, letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

1, 2, 3, 4, 5, 6: Promedio a la misma temperatura y diferente pH, números diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

En la fig. 5, se grafica el efecto de la temperatura sobre la actividad celulolítica de las EC. A pH 5 y 9, se evidenció que la temperatura afectó de manera significativa la actividad específica. Afectó de manera directamente proporcional, es decir a mayor temperatura mayor actividad específica. Sin embargo, a pH 7 no existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los valores de la actividad específica, pero tiene tendencia a incrementar su valor. También podemos mencionar que las actividades más altas se encontraron a 40°C (20.9, 21.4 y 21.8 U/g proteína) y las más bajas a 20°C (13.2, 17.3 y 17.7 U/g proteína).

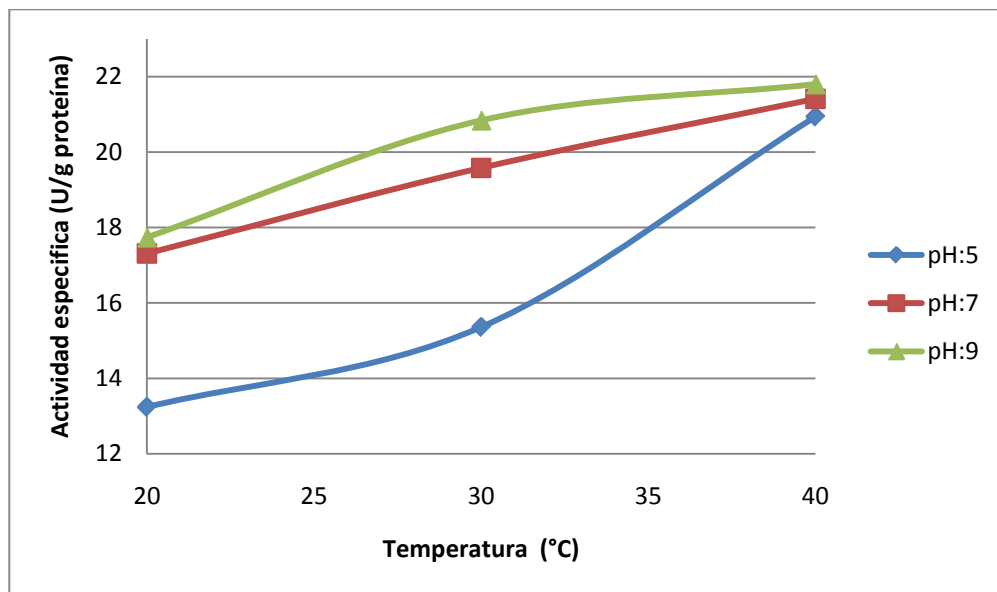


Figura 5: Efecto de la temperatura sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

En la figura 6, se grafica el efecto del pH sobre la actividad celulolítica de las EC, al igual que la temperatura, el efecto del pH fue directamente proporcional al incremento de pH. Sin embargo, este efecto sólo se evidenció a cuando la temperatura era 20°C y 30°C, mas no a 40°C, donde no hubo diferencia estadística significativa entre los valores pero si una tendencia numérica a incrementarse. Las actividades más altas se evidenciaron a pH 9 (17.7 y 20.8 U/g proteína) y las más bajas a pH 5 (13.2, 15.4 U/g proteína).

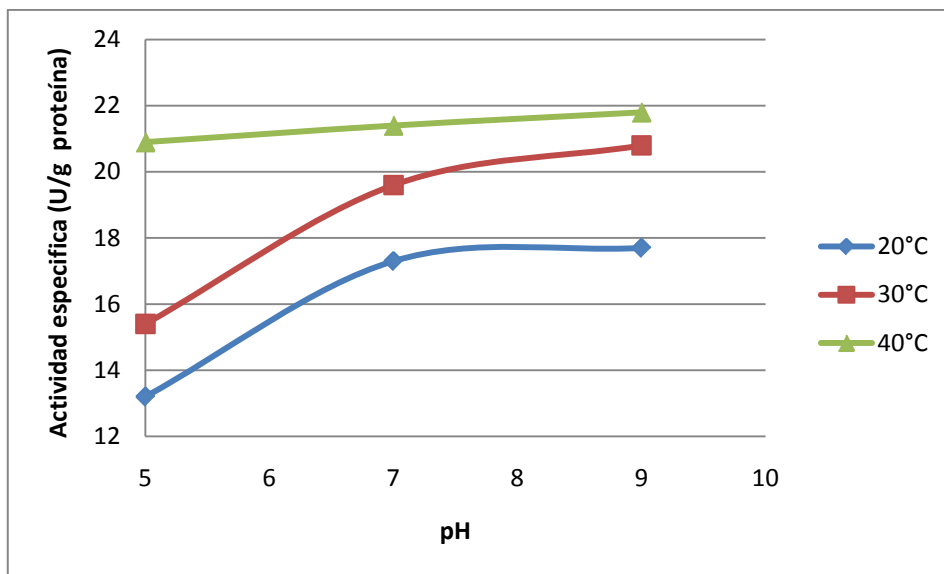


Figura 6: Efecto del pH sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

Por lo tanto; la actividad específica de las EC más alta (**21.8 ± 3.2 U/g proteína**) se encontró a la temperatura máxima que se utilizó en este ensayo (40°C) y al pH alcalino de 9. La actividad específica más baja (**13.2 ± 2.2 U/g proteína**) se encontró a la temperatura más baja que se utilizó en este ensayo (20°C) y al valor de pH 5.

IV.2. ACTIVIDAD AMILOLÍTICA

La actividad amilolítica de las EC de cuyes fue medida a diferente pH y temperatura. Los datos individualizados se encuentran en el Apéndice 4. En el cuadro 5, se presentan los promedios de las actividades amilolíticas expresadas como actividad específica (U/g proteína). Sólo la temperatura afectó la actividad amilolítica de las EC.

Cuadro 5: Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad amilolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

Temperatura °C	pH		
	5	7	9
	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)
20	188.7±46.7 ^a	174.1±52.7 ^d	150.4±40.2 ^f
30	329.7±106.4 ^{b,c}	308.6±127 ^{d,e}	319.6±93.8 ^g
40	441.4±181.5 ^c	452.7±135.1 ^e	499.3±129.9 ^h

a, b, c, d, e, f, g, h: Promedio al mismo pH y diferentes temperatura, letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

La actividad amilolítica de las EC aumentaba a medida que la temperatura se incrementaba de 20°C a 40°C, es decir la actividad específica aumenta directamente proporcional a la temperatura, observándose las menores actividades a bajas temperaturas y las más elevadas a temperaturas altas (Figura 7), al igual que la actividad celulolítica.

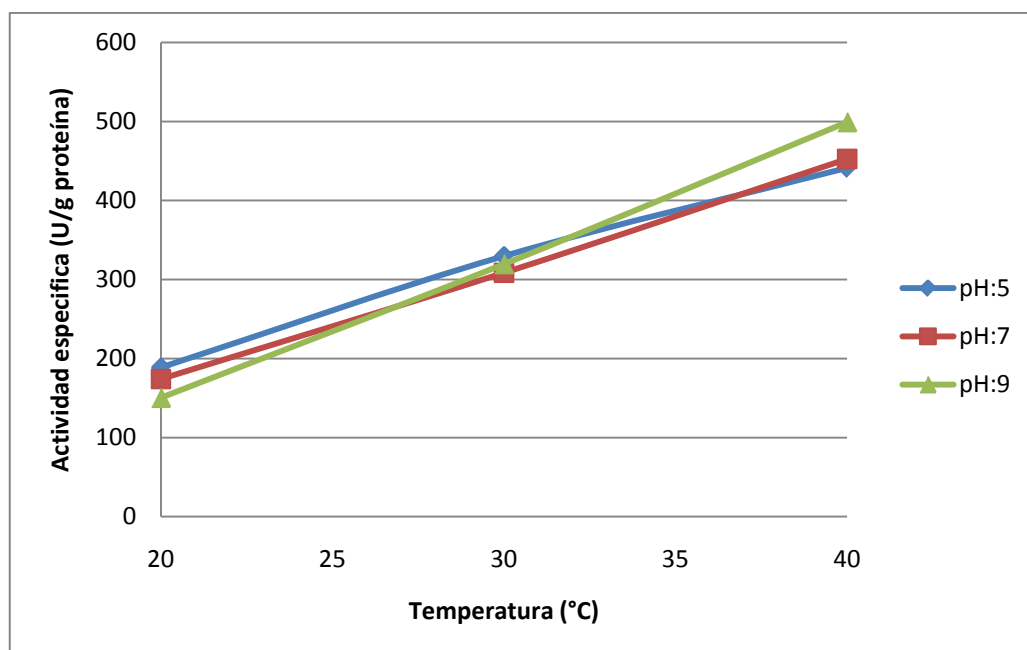


Figura 7: Efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

El gráfico que describe el efecto de la temperatura sobre la actividad amilolítica, es muy similar en el caso de los tres valores de pH, es decir muestran el mismo patrón. Sin embargo a pH 9 hay diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en los tres valores de temperatura, como no es el caso de los demás valores de pH. También podemos mencionar que las actividades específicas son muy parecidas en todos los valores de pH, aunque no hay diferencia significativa, existe una ligera diferencia numérica entre estos tres valores, siendo el pH 7 (308.6 U/g proteína) el cual tiene el valor más bajo respecto a los otros valores (329.7 y 319.6 U/g proteína) para pH 5 y 7 respectivamente. Cuando se evaluó las EC con capacidad amilolítica a 40°C se observa que a pH 9 mostró un ligero incremento de la actividad específica (499.3 U/g proteína) respecto a los pH 5 y 7, los cuales mostraron valores muy cercanos (441.4 y 452.7 U/g proteína).

Por lo tanto; la actividad específica de las EC más baja se presentó a 20°C (**188.7, 174.1 y 150.4** U/g proteína) y la más alta a 40°C (441, 452.7 y 499.3 U/g proteína).

IV.3. ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

La actividad proteolítica de las EC de cuyes fue medida a diferente pH y temperatura. Los datos individualizados se encuentran en el Apéndice 5. En el cuadro 6, se muestran los promedios de las actividades proteolíticas, expresadas como actividad específica (U/g proteína). Las EC de cuyes no mostraron una actividad proteolítica uniforme, tuvieron respuestas diferentes para cada condición a la que estuvo expuesta. Tanto la temperatura como el pH afectaron la actividad específica de las EC.

Cuadro 6: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

Temperatura °C	pH		
	5	7	9
	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)
20	290±91.4 ^{a,1}	221±51.3 ^{c,1,2}	162±37.6 ^{d,2}
30	183±49.1 ^{a,b,3}	209±41.9 ^{c,3}	104±53.2 ^{d,4}
40	140±74.9 ^{b,5}	176±50.4 ^{c,5}	225±45.1 ^{e,5}

a, b, c, d, e: Promedio al mismo pH y diferentes temperatura, letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

1, 2, 3, 4, 5: Promedio a la misma temperatura y diferente pH, números diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

En la figura 8, se observa el efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica de las EC. Cuando el pH es 5, podemos observar que hay diferencia entre la actividad específica a 20°C y 40°, disminuyendo su valor a medida que se incrementa la temperatura. Comportamiento contrario se presenta cuando el medio esta a pH 9, ya que el valor de la actividad específica aumenta a medida que aumenta la temperatura de 20°C a 40°C.

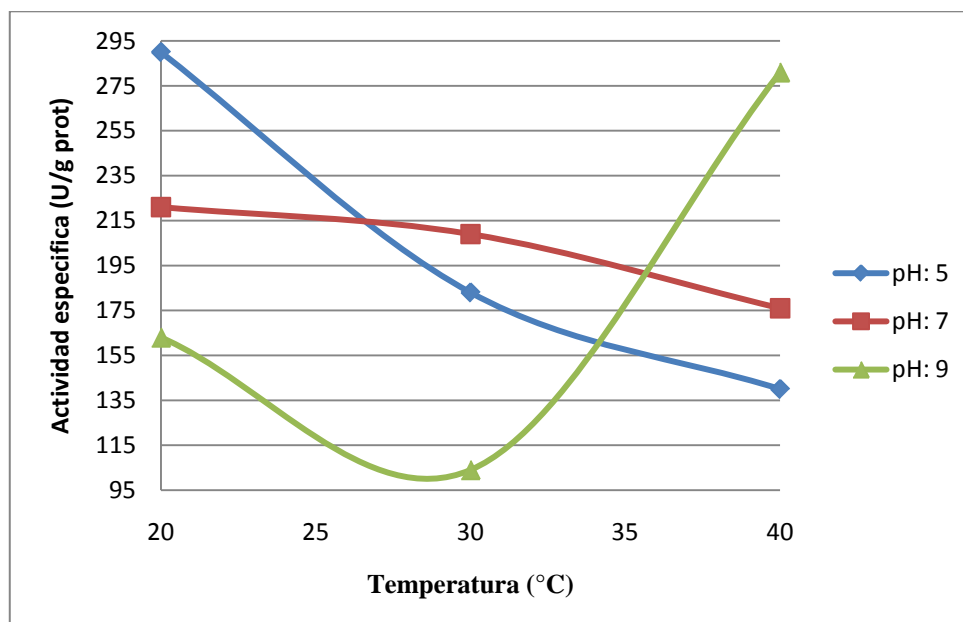


Figura 8: Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

En la figura 9, se grafica el efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las EC. Se observa que cuando la temperatura es 20°C, la actividad proteolítica disminuye a l incrementarse el pH, es decir de 290 ± 91.4 baja a 162 ± 37.6 U/mg proteína. Cuando la temperatura es 30°C, la actividad proteolítica también disminuye a medida que el pH aumenta.

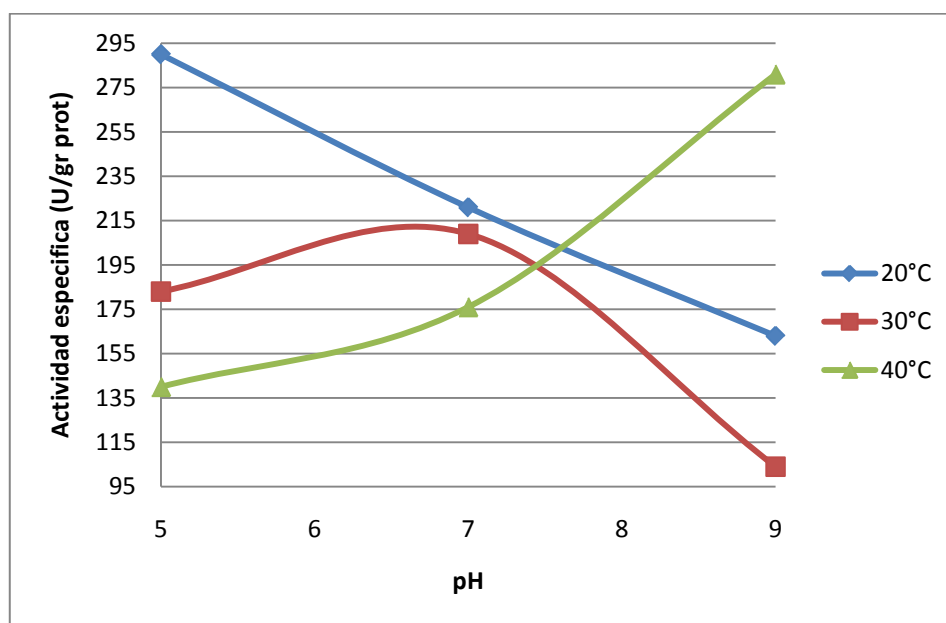


Figura 9: Efecto del pH sobre la actividad proteolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes

Las actividades específicas de las EC más bajas (104, 162 U/g proteína) se presentaron a 20° y 30°C y pH 9. Los valores más altos de actividad específica se presentaron a 20° y 30° y pH 5 (290 y 183 U/g proteína).

IV.4. ACTIVIDAD LIPOLÍTICA

La actividad lipolítica de las EC de cuyes fue medida a diferente pH y temperatura. Los datos individualizados se encuentran en el Apéndice 6. En el cuadro 7, se muestran los promedios de las actividades lipolíticas, expresadas como actividad específica (U/mg proteína). El pH afectó la actividad lipolítica de las EC, la temperatura sólo afectó la actividad específica de las EC a 40°C (el pH del medio fue 9). Las EC de

cuyes no mostraron una actividad lipolítica uniforme, tuvieron respuestas diferentes para cada condición a la que estuvo expuesta.

Cuadro 7: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lipolítica (U/mg proteína) de las enzimas cecales de cuyes

Temperatura °C	pH		
	5	7	9
	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)	($\bar{x} \pm \sigma$)
20	3.07±0.51 ^{a,1}	2.80±0.60 ^{b,1}	2.55±1.10 ^{c,1}
30	3.01±0.83 ^{a,2,3}	2.23±0.74 ^{b,2}	3.59±0.49 ^{c,d,3}
40	3.18±0.32 ^{a,4}	2.94±0.328 ^{b,4}	4.05±0.45 ^{d,5}

a, b, c, d: Promedio al mismo pH y diferentes temperatura, letras diferentes en la misma columna, indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

1, 2, 3, 4, 5: Promedio a la misma temperatura y diferente pH, números diferentes en la misma fila, indican diferencia estadística significativa (p<0.05)

En la figura 10 podemos observar el efecto del pH sobre la actividad lipolítica. A 30°C, la actividad lipolítica de las EC se incrementó cuando el pH aumentó, es decir cuando el pH es 7, la actividad lipolítica es de 2.23 U/mg proteína se incrementó a pH 9 (3.59 U/mg proteína). Cuando la temperatura es 40°C, al igual que a 30°C, el valor de la actividad proteolítica se incrementa a medida que el pH aumenta.

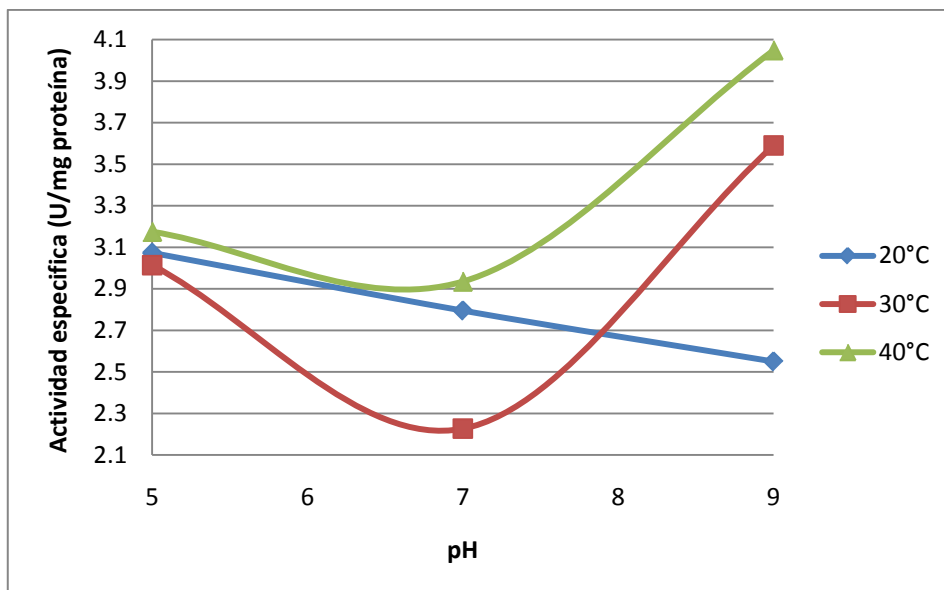


Figura 10: Efecto del pH sobre la actividad lipolítica (U/mg proteína) de las enzimas cecales de cuyes

La temperatura sólo afectó la capacidad lipolítica de las EC cuando se expuso a 40°C y el pH del medio fue 9. En los demás casos no hubo diferencia estadística significativa, pero si una tendencia numérica, ya que a 20°C se mostraron los valores intermedios, a 30°C los valores más bajos y a los 40°C más altos.

La actividad específica de las EC más baja se presentaron a pH 5 y 7 (2.23, 2.94 y 3.18 U/mg proteína) y la actividad específica más alta se presentó a pH 9 (3.59 y 4.049 U/mg proteína).

V. DISCUSION

La prohibición al uso de antibióticos como promotores de crecimiento en las raciones de animales que serán destinados al consumo humano, debido a los problemas en la salud pública, ha traído consigo la búsqueda de estrategias de reemplazo al uso de antibióticos. Dentro de las alternativas de reemplazo se pueden mencionar el uso de probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgánicos, extractos naturales, entre otros. El empleo de estos aditivos en la alimentación animal ha evidenciado respuestas positivas.

En este estudio se caracterizó las enzimas que se encuentran en el ciego del cuy. En la actualidad no se cuenta con la caracterización de la población bacteriana cecal del cuy, más la caracterización de sus enzimas indicará la actividad bacteriana en esta región, dicha flora podría incluir alguna especie que tenga potencial biotecnológico, el cual podría ser utilizada para optimizar la utilización de raciones brindadas a cuyes, trayendo consigo efectos benéficos en diversos ámbitos.

En este estudio se logró cuantificar las actividades específicas de las EC con capacidad celulolítica, amilolítica, proteolítica y lipolítica del cuy. Se cuantificó las actividades específicas sometidas a tres diferentes valores de pH y 3 valores de temperatura.

Los microorganismos degradadores de celulosa incluyen hongos y bacterias, aerobios y anaerobios, mesófilos y termófilos que ocupan una variedad de hábitats (Aubert *et al.*, 1988). Podemos mencionar algunas bacterias anaerobias como: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Butirivibrio sp.*, *Bacteroides cellulosolvens*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium cellulovarans*, *Clostridium thermocellum*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* (Lynd *et al.*, 2002).

La mayor actividad de las celulasas se presentó a un pH alcalino, mientras que en el caso del estudio realizado por Gaitán y Pérez (2007) obtuvieron la mayor actividad enzimática de celulasas de *Bacillus sp.* y *Streptomyces sp.* a pH 7. Además, Howard *et al.* (2003), mencionaron que el pH óptimo de las celulasas producidas por bacterias abarca un amplio rango, el cual incluye tanto condiciones ácidas como alcalinas, sin embargo las celulasas producidas por hongos requieren generalmente un pH ácido. En un estudio realizado en rumiantes por Galindo *et al.* (2004), evidenciaron que la actividad celulolítica del *Ruminococcus albus* y de la mezcla de bacterias ruminales fue máxima con valores de pH 5.5 y 6. En el caso de bacterias ruminales el pH óptimo para muchas bacterias hidrolíticas importantes se hallan por encima de 6.

La actividad celulolítica, estuvo influenciada por la temperatura y el pH. Así, Valiño (1999), menciona que la acción de las enzimas celulasas puede afectarse por numerosos factores, como la adsorción de la enzima al sustrato, la inactivación de la enzima con el tiempo, el pH, la temperatura, la concentración de nitrógeno, además de la inhibición de la enzima con el tiempo de la reacción, la presencia de proteasas producidas por microorganismos, entre otros.

Respecto al efecto de la temperatura sobre la actividad celulolítica, en este estudio se observó que los valores más altos se dieron a 40°C, resultados similares a los obtenidos por Gaitán y Pérez (2007), que obtuvieron una actividad más elevada a 37°C que a 50°C.

En el conejo, la actividad fibrolítica de la microbiota tiene lugar en el ID y en el ciego, predominando en ambos segmentos la actividad pectinolítica frente a la xilanolítica y

celulolítica los factores de variación de esta actividad fibrolítica se desconocen, si bien a nivel cecal parece que un pienso deficitario en fibra podría reducirla (García *et al.*, 2006).

Existe un número limitado de cepas de bacterias lácticas capaces de hidrolizar almidón. La mayor parte de las amilasas producidas por estas bacterias son extracelulares, pero algunas están ligadas a la célula. Las actividades amilolíticas observadas son muy variables pero normalmente son inferiores a las de los mohos, las levaduras o bacterias de la familia Bacillaceae. Estas enzimas son constitutivas, pero su actividad puede incrementarse con inductores, como la maltosa. *Streptococcus bobis*, *Pediococcus darnnosfis* y algunas otras bacterias lácticas también han mostrado actividad amilolítica (Escamilla, 2000).

Las EC de cuyes presentaron actividad amilolítica más elevada a 40°C. Resultado que concuerdan con los obtenidos en el estudio realizado por Herbert *et al.* (1996, Citado por Rojo *et al.*, 2007), donde las amilasas de *Bacillus lechiniformis*, las cuales reciben gran importancia a nivel industrial debido a su gran capacidad para degradar un amplio tipo de carbohidratos, mostró una gran actividad en el rango de 30 a 90°C, siendo el óptimo a 76°C. Así mismo en este mismo estudio (Herbert *et al.* 1996, citado por Rojo *et al.*, 2007), se reportó gran actividad amilolítica en el intervalo de pH 4 y 9, mientras que las EC en este rango de pH no evidenciaron diferencia entre sus valores.

Los datos de las EC con capacidad amilolítica muestran que esta es casi 10 veces el valor de las EC con capacidad celulolítica, estos datos concuerdan con los resultados encontrados por Marounek *et al.* (1995), quienes reportaron que la actividad celulolítica fue la menor en todos los segmentos del tracto digestivo del conejo. Ellos reportan también que la actividad amilolítica en el ciego es casi 6 veces la actividad celulolítica. Estos hallazgos son consistentes con la baja digestibilidad de la fibra cruda en conejos, la cual a sido reportado por diversos autores. Además, Slade y Hintz (1982) demostraron que el cuy es tan eficiente como el caballo y pony en la digestión de la fibra cruda, además Loosli *et al.* (1939) y Hintz (1961) reportaron que el cuy fue más eficiente en la digestión de la fibra.

Podemos mencionar al *Aspergillus niger*, el caso de los hongos, el cual en el estudio de Henao *et al.* (2006) presentó un rango óptimo de la actividad amilolítica a 60°C. En el caso de la temperatura las EC de cuyes cuando se incrementó la temperatura la actividad específica de las enzimas casi duplicó su valor. En nuestro estudio la actividad específica de las EC con capacidad amilolítica presentó el valor más alto a 40°C. En el estudio de Henao *et al.* (2006), el rango óptimo de pH fue entre 3 y 4, mientras que en el nuestro no hubo efecto del pH.

Dentro de las bacterias que tienen la capacidad de implantarse en la flora intestinal, tenemos a algunas especies de bifidobacterias y *Lactobacillus*. Estas bacterias prebióticas tienen la capacidad de producir proteasas que hidrolizan las proteínas y liberan gran cantidad de péptidos (Baqueiro, 2004).

Las EC con actividad proteolítica, respondieron al efecto de la temperatura en efectos diferentes dependiendo del pH. Así, a pH 9, la actividad se incrementó a medida que se incrementaba la temperatura, en la combinación de pH 9 y 40°C se presentó la mayor actividad enzimática específica. Estos datos son concordantes con proteasa comerciales (Novo Nordisk®) comercializadas que expresan su mayor actividad bajo los rangos de pH a pH 8,5 – 10,5 y a la temperatura de 55°C. (Cegarra *et al.*, 2000)

En cuanto al efecto del pH sobre la actividad proteolítica de las EC, al igual que el efecto de la temperatura fue variable, aunque a 30°C y 40°C y a pH 9 se encuentra la actividad proteolítica más elevada, mientras que a pH 7 se evidenció las actividades proteolíticas más bajas. Estos resultados difieren de los obtenidos en el estudio realizado por García (1996), quien evaluó las proteasas bacterianas en sistemas de depuración biológica; encontró que la máxima actividad fue a pH 7, por debajo o encima de este valor la actividad proteolítica disminuye, siendo mayor cuando el pH es ácido. También

reporta la mayor actividad en el rango de temperatura que va desde 10°C-35°C; datos similares a los encontrados en este estudio.

Los microorganismos que producen lipasas no manifiestan la producción de estas enzimas de la misma manera. Existiendo diferencias importantes entre los niveles de actividad lipolítica expresados por los hongos, bacterias y levaduras. Las respuestas variables son atribuibles al tipo de sustrato, así mismo la posibilidad de presentar actividad lipolítica intracelular (Coca *et al.*, 2001).

Coca *et al.* (2001) evaluó la actividad de lipasas de los hongos *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*, manteniendo el pH estable a 7, obteniendo la máxima actividad enzimática en un rango de 40 y 60°C para *A. niger* y 80°C para *A. fumigatus*, luego de estas temperaturas la actividad enzimática cayó, atribuidas a una inactivación térmica. En nuestro estudio no se evidencio una inactivación térmica, ya que no se determino la actividad máxima, pues no se evaluó temperaturas extremas. Al igual que los resultados presentados por Coca *et al.* (2001) la tendencia de la actividad enzimática de las lipasas tienden a incrementarse con el efecto de la elevación de la temperatura.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática de las lipasa de los hongos *A. fumigatus* y *A. niger* se manifestó presentando la actividad enzimática máxima a pH 6 para *A. niger* y pH 7 para *A. fumigatus*. En nuestro estudio a pH 6 y 7 es donde se obtuvo la actividad más baja, y a medida que el pH aumentaba la actividad también aumentaba. En el caso de la actividad enzimática sometida a 20°C, decayó bruscamente a medida que el pH aumentaba.

En el estudio realizado por Castro *et al.* (2003), evaluó la lipasa de *Bacillus thermoleovorans*, la lipasa CCR11 tiene un pH óptimo de 9 y es estable en un rango de pH de 5 a 11. La temperatura óptima de esta lipasa fue de 60°C. El género *Bifidobacterium*, fue caracterizado por Collado (2004), ninguna de las cepas

evaluadas presentó una actividad lipolítica. La mayoría de los probióticos son bacterias del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* aunque también se emplean algunos otros géneros como *Enterococcus*, *Streptococcus*, y *Saccharomyces*.

El potencial que poseen los microorganismos que habitan en el ciego del cuy es muy prometedor, ya que como se demostró en este estudio la actividad tanto amilolítica como celulolítica son estables a diferentes temperaturas y pH, estas podrían exhibir un efecto benéfico al administrarla a cuyes jóvenes, ya su sistema enzimático aun no está totalmente desarrollado ni es capaz de soportar el cambio de dieta.

Es prometedor el resultado de la actividad amilolítica de las EC de cuyes, ya que se podrían aplicar en el campo de la biotecnología. Dentro de los beneficios que traerían sería mejorar la digestión de los carbohidratos que lleguen al ciego sin digerirse, pues en etapas tempranas de la vida el páncreas no se encuentra en la capacidad de digerir grandes cantidades de almidón, evitando de esta manera algunas patologías digestivas que traen consigo la no digestión de los almidones.

Será necesario hacer una caracterización de la microbiota cecal de los cuyes para poder aislar a las bacterias con posible potencial biotecnológico. Dentro de las posibles aplicaciones se pueden mencionar producción de enzimas para su uso en la alimentación animal, aislar especies con capacidad probiótica entre otras. En el caso de la adición de enzimas en la alimentación de cuyes, han expresados resultados benéficos ya que permite al animal expresen un mejor rendimiento, provechando mejor los nutrientes que se les brinda en la dieta.

VI. CONCLUSIONES

- Las enzimas cecales del cuy con capacidad celulolítica, presentaron mayor actividad específica a pH 9 y 40°C, mientras que la menor actividad se presentó a pH 5 y 20°C.
- Las enzimas cecales del cuy con capacidad amilolítica, presentaron mayor actividad específica a 40°C, mientras que la menor actividad se presentó a 20°C. La actividad de las amilasas cecales no fue afectada por el pH.
- La actividad amilolítica fue 10 veces más alta que la actividad celulolítica.
- Las enzimas cecales del cuy con capacidad proteolítica, presentaron mayor actividad específica a pH 5 y 20°C, mientras que la menor actividad se presentó a pH 9 y 30°C.
- Las enzimas cecales del cuy con capacidad lipolítica, presentaron mayor actividad específica a pH 9, mientras que la menor actividad se presentó a pH 5. La actividad de las lipasas cecales no fue afectada por la temperatura.

VII. RECOMENDACIONES

- Caracterizar la microbiota presente en el ciego de cuyes.
- Aislar las especies que tengan potencial biotecnológico.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Alexander M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. 2da edición. México: AGT Editor SA. 491p.
2. Aliaga L. 1995. Importancia de la crianza de cuyes en el ecosistema Andino. En: Serie Didáctica: Crianza de Cuyes. Lima: INIA-CIID. p 1-12.
3. Amber KA. 1997. Efecto de la fibra y el almidón del pienso sobre la digestibilidad fecal e ileal en conejos adultos. Tesis Doctoral. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia. 84p.
4. Aubert JP, Beguin P, Mille J. 1988. Biochemistry and Genetics of Cellulose degradation. USA: Academic press. 448p.
5. Balcao, V.M.; Malcata, F.X.; 1996. Reactors with immobilized lipase: mathematical modelling. En engineering of/with lipases. Malcata FX. Ed. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, p. 435-454.
6. Baqueiro, I. 2004. Determinación de la actividad proteolítica de bacterias utilizadas como probióticos presentes en leches fermentadas comerciales. Tesis para optar el grado de especialista en Biotecnología. México: Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. 94p.
7. Bondi, AA. 1988. Nutricion Animal. Zaragoza: Ed. Acribia. 768p.
8. Bornscheuer U, Reif OW, Laush R, Freitag R, Scheper T, Kollis FN, Menge U. 1994. Lipase of Pseudomona cepacia for biotechnological purpose:

- purification, crystallization and caracterizacion. Biochim. Biophys. Acta. 1201, p. 55-60.
9. Boulahrouf A, Fonty G, Gouet PH. 1991. Establishment, count and identification of the fibrolytic bacteria in the digestive tract of rabbit. Influence of beed cellulose content. Curren Microb. 22:21-25
 10. Bustamante J. 1993. Producción de cuyes. 1ra ed. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de Medicina Veterinaria. 259 p.
 11. Cabrera A. 1953. Los roedores argentinos de la familia *Cavidae*. Publicación 6:48-56. Universidad de Buenos Aires. 93p.
 12. Carrera J. 2003. Production and application of industrial enzymes. Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1:1:10-15.
 13. Castro H. 2002. Sistema de crianza de cuyes a nivel familiar-comercial en el sector rural. Benson Agriculture and food Institute Brigham Young University. USA. Internet], [12 julio 2010]. Disponible en: <http://www.bensoninstitute.org/publication/thesis/sp/cuyecuador.pdf>
 14. Castro DL, Rodriguez C, Valerio G, Oliart RM. 2003. Purificación y caracterización parcial de la lipasa producida por la bacteria termófila *Bacillus thermoleovorans* CCR11. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 8 a 12 de septiembre, 2003. Puerto Vallarta, Jalisco- México.
 15. [CEA] Centro de estudios Agropecuarios. 2001. Crianza de cuyos. México. Grupo Editorial Iberoamérica. 92 p.
 16. Cegarra J, Gacén J, Cayuela D. 2000. Blanqueo de lana en presencia de proteasas. Boletín Intexter (U.P.C.) Nº 118: 41-43.
 17. Chauca FL. 1995. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*) en los países andinos. Revista Mundial de Zootecnia 83(2):9-19.
 18. Chauca L, Saravia J. 1976. Nutrición y alimentación de cuyes. Resúmenes 1º Curso Nacional de cuyes. Huancayo - Perú.
 19. Chauca L. 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas Para la Agricultura y la Alimentación. Roma: FAO. 120p. [Internet], [10 julio 2010] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/W6562S/W6562S00.htm>
 20. Chávez MA, Díaz J, Pérez U, Delfín J. 1990. Temas de enzimología. Cuba: Ed. Min. Educación Superior. 567 p.

21. Coca J, Hernández O, Berrio R, Martínez S, Díaz E, Dustet JC. 2001. Producción y caracterización de lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología aplicada*. 18: 216- 220.
22. Collado, M. 2004. Caracterización de cepas del genero *Bifidobacterium* con carácter probiótico. Tesis para optar al grado de Doctor Ingeniero Agrónomo. España: Universidad Politécnica de Valencia. 251 p.
23. Colowick SP, Kaplan NO. 1955. Preparation and assay of enzymes. En: *Methods in Enzymology*. Vol. I. New York : Academic Press INC. Publishers. 835 p.
24. Crociani F, Biavat F, Castagnoli P, Matteuzzi D. 1984. Anaerobic ureolytic bacteria from caecal content and soft faeces of rabbit. *J Appl Bact* 57: 83-88.
25. De Blas C, García J, Gómez-Conde S, Carabaño R. 2002. Restricciones a la formulación de piensos. Publicaciones del XVIII Curso de especialización FEDNA, Barcelona-España. [Internet] [20 agosto 2010]. Disponible en: http://fundacionfedna.org/sites/default/files/02CAP_V.pdf
26. Doolittle RF. 1985. Proteínas. *Investigación y Ciencia* 111: 54 – 64.
27. Escamilla M. 2000. Producción de diacetilo y otros compuestos aromatizantes relacionados, por bacterias lácticas en cultivos axenicos mixtos a base de maíz. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. México: Universidad Autónoma Metropolitana. 335p.
28. [FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2001. Mejorando la nutrición a través de huertos y granjas familiares. Manual de capacitación para trabajadores de campo en América latina y el Caribe. Roma: FAO. 82 p.
29. Forsythe S, Parker D. 1985. Urea turnover and transfer to the digestive tract in the rabbit. *Br J Nutr* 53:183-190.
30. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Apl Bact*. 66: 365- 378.
31. Fuller, R. 1997. Introduction. En: *Probiotics: 2. Applications and Practical Aspects*. R. Fuller. Ed. Londres, Chapman and Hall. 1-9p.
32. Gaitán D, Pérez L. 2007. Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendhranthea grandiflora*). Tesis para optar el

- titulo de Microbióloga Industrial. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana. 97 p.
33. Galindo J, Marrero Y, González N, Aldama AI. 2004. Caracterización de la actividad celulolítica en el líquido de rumen filtrado. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 38 (3): 259-263.
 34. García J. 1996. Actividad de las proteasas bacterianas en sistemas de depuración biológicos. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias Químicas. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid. 252 pp.
 35. Ghoshal NG, Bal HS. 1989. Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory Animals*. 23: 21-29.
 36. Gómez C, Vergara V. 1995. Fundamentos de la nutrición y alimentación. Serie Guía didáctica sobre crianza de cuyes, INIA-CIID, Lima –Perú.
 37. Guadix A, Guadix E, Páez-Dueñas M, Gonzales-Tello P, Camacho F. 2000. Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Arspharmaceutica*. 41:1:79-89.
 38. Hampson, DJ, Pluske, JR & Pethick, DW (2001) Dietary manipulation of enteric disease. In *Proceedings of the VIIIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*. pp. 247–261.
 39. Havenaar R, Ten B. 1992. Selection of strains for probiotic. *The Scientific Basis* p. 209 – 224.
 40. Henao I, Franco M, Marin G. 2006. Evaluación de métodos de conservación para *Aspergillus niger* con actividad enzimática amilolítica. *Universitas Scientiarum* 11(002): 51-60.
 41. Hidalgo V. 2000. Crianza de cuyes. Programa de Investigación en carnes. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina. Facultad de Zootecnia. 90 p.
 42. Hill, H. 1983. Distribution of urease producing bacteria in the rabbit caecum. *S. Afr. J Anim Sci* 13:61-62.
 43. Hintz HF. 1961. The effect of autoclaving on the nutritive value of hay. Thesis. Cornell University, Ithaca, New York.
 44. Holtenius K, Bjornhag G. 1985. The colonic separation mechanism in the guinea pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Comparative biochemistry and Physiology* 824(3):537-542.

45. Howard R, Abotsi E, Rensburg J, Howard S. 2003. Lignocellulose Biotechnology: issues bioconversion and enzyme production. African Journal of Biotechnology. 2: 602-619.
46. [INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2007. Censos Nacionales 2007: IX de Población y VI de Vivienda. Primeros Resultados. Perú.
47. [INIA] Instituto nacional de Investigación Agraria. 2003. Proyectos de la DNI de crianzas. [Internet] [15 agosto 2010]. Disponible en: http://www.portalagrario.gob.pe/Politica/inia2_kApendice11.pdf.
48. Lehninger A. 1979. Bioquímica. 2da edición. La habana: Ed. Revolucionaria. 1117p.
49. Lindal J. 2004. Enzimas: Clasificación, cinética y control. En: Devlin T, ed. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ta edición, España. Editorial Reverté S.A. p 413-463.
50. Loosli JK, Richards BL, Maynard LA, Massey LM. 1939. The effect of sulfur dioxide on the nutritive value of alfalfa hay. Councill U. Ag. Exo. Sta. Menoir 227.
51. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951 J. Biol. Chem. 193: 265-275.
52. Lynd L, Weimer P, Zyl H, Pretorius I. 2002. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and Biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 16: 506-677.
53. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003. Brock-Biology of Microorganisms. 10° ed. Prentice Hall, Upper Saddle River. Cap. 5, 17, 19.
54. Marounek M, Vovk SJ, Skrivanová V. 1995. Distribution of activity of hydrolytic enzymes in the digestive tract of rabbits. Br. Nutr. 73, 463-469.
55. Márquez C, Piramanrique K, Carrascal A, Clavijo B, Quevedo B. 2007. Determinación cuantitativa de proteasas de bacterias psicrófilas aisladas de leche cruda. Pontificia Universidad Javeriana. [internet] [29 octubre 2011] disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/411/41150702.pdf>
56. Maxhua V, Cook F. 1990. Mediciones del sistema digestivo de cuyes criollos de la microrregión de Cangallo. En: XIII Reunión Científica Anual APPA. Ayacucho: Asociación Peruana de Producción Animal.

57. Mc Donald P, Edwards R, Greenhalgh J. 1981. Nutrición Animal. Zaragoza. España: Ed. Acribia. 576 p.
58. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31 (3) : 426-428.
59. Moreno R. 1989. El cuy. 2da ed. Lima. Universidad Nacional Agraria la Molina. 128 p.
60. Muller HG. 1988. An introduction to tropical food science. Cambridge University Press. 316 p.
61. Nicodemus N, García J, Carabaño R, De Blas C. 2003. Utilización de enzimas en piensos en conejos. Rev. Cunicultura. Junio, 2003. España. Cap. Alimentación. pp. 149-153.
62. Noonan D. 1994. The guinea pig (*Cavia porcellus*). Anzccart News 7 (3): 123-125.
63. Ordoñez J. 2005. Probióticos y enzimas en el rendimiento productivo de conejos destetados. Tesina para optar el Título profesional de Médico Veterinario. Lima: Universidad nacional Mayor de San Marcos. 28 p.
64. Ordoñez R. 1998. Efecto de dos niveles de proteína y fibra cruda en el alimento de cuyes (*Cavia porcellus*) en lactación y crecimiento. Tesis para optar el título de Ingeniero Zootecnista. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina. 86 p.
65. Orson N. 1972. The guinea pig. Dto. Agricultura Library USA. 73 p.
66. Padilha M, Licois D, Gidenne T, Carre B, Fonty, G. 1995. Relationship between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. Reprod. Nutr. Dev. 35: 375-386.
67. Pascual M, Garrega M, Monfort JM. 1996. Los probióticos en la alimentación animal. Eurocarne 44: 91 – 96.
68. Peeters JE, Orsenigo R, Maertens L, Gallozi D, Collin M. 1993. World Rabbit Sci. 1:53.
69. Percy, D.; Barthold, S. 2001. Laboratorio de patología de roedores y Conejos. 2da ed. Iowa State University Press, Ames. 206 p.
70. Pokorny D, Friedrich J, Cimerman A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. Biotech Lett; 16:363-6.
71. Quintana E. 2009. Suplementación de dietas a base de alfalfa verde con harina de cebada mas una mezcla mineral y su efecto sobre el rendimiento y eficiencia

- productiva en cuyes en crecimiento en el Valle del Mantaro. Tesis para optar el título de Médico veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 62 p.
72. Raibaud P. 1992. Bacterial interactions in the gut. En: Probiotics: Scientific Basis, R. Fuller Ed. Chapman & Hall, Londres, Pp. 9 – 28.
 73. Reyes J. 2008. Revisión de la sanidad en cobayos. Tesina para optar el Título profesional de Médico Veterinario. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 91 p.
 74. Rigoni M, Castrovilli C, Cicogna M. 1993. The digestive utilization of nutrients and energy in the guinea pig and rabbit. 10th National Congress Scientific Association of Animals Production. Bologna, Italia.
 75. Rofes J. 2000. Sacrificio de cuyes en El Yaral, comunidad prehispánicas del sur peruano. Bull Inst fr études andines 29(1):1-12.
 76. Rojo R, Mendoza GD, Montañez OD, Rebollar S, Cardoso D, Hernández J, Gonzales FJ. 2007. Enzimas amilolíticas exógenas en la alimentación de rumiantes. Universidad y Ciencia 23(002): 173-182.
 77. Rosmini M. 2004. Producción de prebióticos para animales de abasto: Importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. Revista de Ingeniería Química. 3: 181-191.
 78. Sakaguchi E, Kaizu K, Nakamichi M. 1992. Fibre digestion and digesta retention from different physical forms of the feed in the rabbit. *Comp. Biochem. Physiol.* 102: 559–563.
 79. Salinas M. 2002. Crianza y comercialización de cuyes. 1ra ed. Lima. Ediciones Ripalme. 135p.
 80. Samuelsson G. 1991. Assays for pharmacological activity: non-specific assays. En: Methods in Plant Biochemistry. Academic Press Limited, vol. 6. U.K. p.261-275.
 81. Schlegel HG. 1993. General microbiology. 7 ed. Cambridge University Press. p. 234-244, 446-464
 82. Schmid RD, Verger R. 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem Int Ed* 37(16): 08-33.
 83. Secades P, Guijarro JA. 1999. Characterization and purification of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of

- culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9):3969-3975.
84. Shoham Y, Lamed R, Bayer EA. 1999. The cellulosome concept as an efficient microbial strategy for the degradation of insoluble polysaccharides. *Trends in Microbiology* 7: 275-281.
 85. Slande LM, Hintz HF. 1982. Comparison of digestion in horses, ponies, rabbits and guinea pigs. *British Journal of Nutrition* 58: 149-158.
 86. Smith A. 1962. *Fisiología de la lactancia*. San Jose: Editorial SIC-IICA. 282 p.
 87. Valiño, E. 1999. Fermentación en estado sólido del bagazo de caña por especies de hongos conidiales productores de celulasas. Tesis PhD. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba.
 88. Vaughan EE, Hilig HG, Zoetendal EG, Sato R, Collins JK. 1999. Molecular approaches to study probiotic bacteria. *Trends in Food Science and Technology* 10: 400 – 404.
 89. Villanueva Y. 2001. Crianza de cuyes. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina. 27p.
 90. Yu B, Tsen HY. 1993. An in vitro assessment of several enzymes for the supplementation of rabbit diets. *Animal Feed Science and Technology* 40: 309-320.
 91. Zevallos D. 2001. El cuy su cría y explotación. 1ra ed. Lima. Ediciones Enrique Capelleti. 190 p.
 92. Zoetendal EG, Collier CT, Koike S, Mackie RI, Gaskins H. 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *J. Nutr.* 134 (2): 465-472.

APENDICE

APENDICE 1

Cuadro A1: Pesos de cuyes

N° Animal	Peso (g)
1	1056
2	979
3	1015
4	1076
5	984
Promedio	1022 \pm 43

APENDICE 2

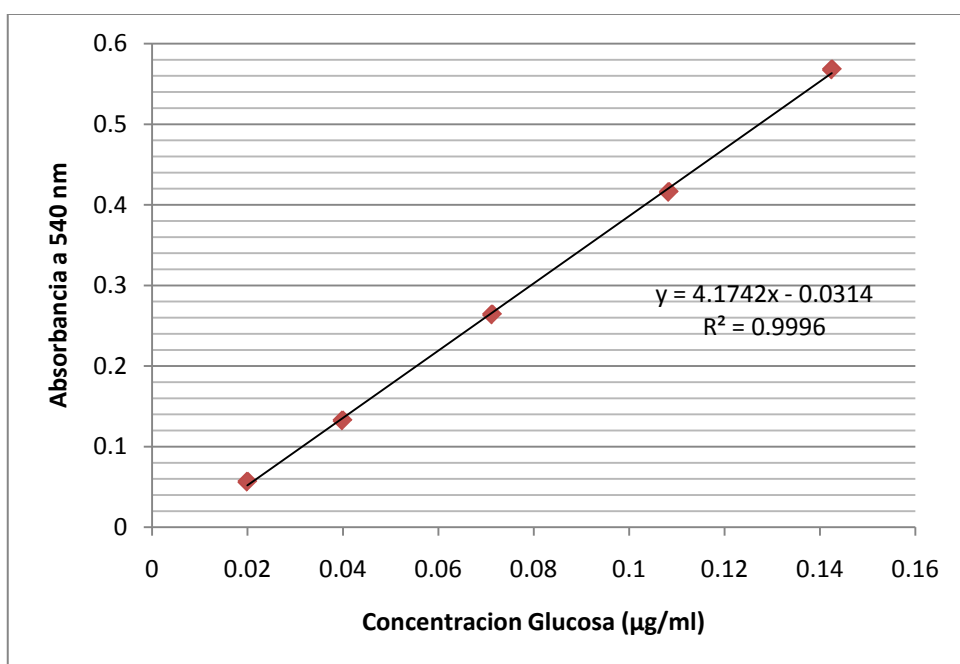


Figura A1: Curva estándar de glucosa

APENDICE 3

Cuadro A2: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad celulolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.

Individuo	Temperatura								
	20 °C			30°C			40°C		
	pH			pH			pH		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9
1	11.10	14.88	15.05	11.57	15.94	18.19	19.13	17.24	23.15
2	15.35	20.32	20.51	15.13	21.29	23.77	25.29	24.64	25.72
3	15.84	18.84	19.30	19.04	23.95	24.66	23.65	25.66	23.25
4	11.77	16.24	16.67	14.62	17.15	17.66	16.85	19.08	18.07
5	12.12	16.27	17.16	16.43	19.54	19.94	19.78	20.41	18.82
Promedio	13.24	17.31	17.74	15.36	19.58	20.84	20.94	21.41	21.80
σ	2.19	2.21	2.17	2.72	3.21	3.21	3.45	3.61	3.24

APENDICE 4

Cuadro A3: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad amilolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.

Individuo	Temperatura								
	20 °C			30°C			40°C		
	pH			pH			pH		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9
1	154.59	139.00	126.84	260.76	229.23	274.34	459.40	374.49	420.31
2	228.13	210.19	183.93	384.93	358.45	371.21	206.55	518.18	582.58
3	205.17	241.85	164.78	315.92	269.52	312.01	490.72	399.61	462.76
4	125.35	111.14	91.96	207.67	181.79	196.81	352.01	315.77	353.53
5	230.37	168.17	184.36	479.40	503.80	443.52	698.05	655.23	677.40
Promedio	188.72	174.07	150.37	329.74	308.56	319.58	441.35	452.66	499.32
DE	46.74	52.73	40.17	106.41	126.98	93.81	181.50	135.08	129.88

APENDICE 5

Cuadro A4: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.

Individuo	Temperatura								
	20 °C			30°C			40°C		
	pH			pH			pH		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9
1	310.69	133.15	114.13	188.10	209.24	107.79	107.79	133.15	627.72
2	261.13	243.73	179.89	119.93	203.10	17.41	243.73	164.42	216.64
3	172.20	258.30	202.70	208.08	177.58	156.06	193.73	263.68	274.45
4	425.05	250.67	185.28	152.58	174.38	103.54	70.84	158.03	98.09
5	282.58	218.35	132.73	246.90	278.30	137.01	85.63	162.70	185.53
Promedio	290.33	220.84	162.94	183.12	208.52	104.36	140.34	176.40	225.54
DE	91.42	51.26	37.62	49.09	41.90	53.18	74.87	50.39	45.12

APENDICE 6

Cuadro A5: Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad lipolítica (U/g proteína) de las enzimas cecales de cuyes.

Individuo	Temperatura								
	20 °C			30°C			40°C		
	pH			pH			pH		
	5	7	9	5	7	9	5	7	9
1	3.05	3.58	2.21	2.37	2.20	2.78	2.79	2.79	3.53
2	3.11	2.92	1.09	3.86	1.10	3.61	3.20	2.69	3.64
3	3.62	2.11	2.61	3.52	2.45	4.10	3.05	2.81	4.17
4	3.34	3.05	2.70	3.41	3.17	3.77	3.66	3.51	4.58
5	2.25	2.31	4.14	1.90	2.22	3.70	3.17	2.88	4.33
Promedio	3.07	2.80	2.55	3.01	2.23	3.59	3.17	2.94	4.05
DE	0.51	0.59	1.10	0.83	0.74	0.49	0.32	0.33	0.45